



**Matilde de Oliveira
Barbosa**

**Papel da oxidase alternativa na resistência ao stress
oxidativo em *Candida krusei***



**Matilde de Oliveira
Barbosa**

**Papel da oxidase alternativa na resistência ao stress
oxidativo em *Candida krusei*.**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Dra. Paula Cristina Ludovico, Professora auxiliar da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho e co-orientação científica do Dr. António Correia Professor associado com agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

O júri

Presidente

Prof.^a Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida,
Professora Auxiliar do departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Orientador

Prof.^a Doutora Paula Cristina da Costa Alves Monteiro Ludovico,
Professora Auxiliar da Escola de Ciências da Saúde, Universidade do Minho

Co-orientador

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia,
Professor Associado com agregação da Universidade de Aveiro

Arguente

Prof.^a Doutora Cidália Irene Azevedo Pina Vaz,
Professora Associada da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Agradecimentos

Agradeço antes de mais à Paula Ludovico, minha orientadora, na ajuda e paciência pela orientação académica, nesta caminhada, que sempre me impulsionou e levou a questionar e vivenciar os conhecimentos.

Ao Professor Doutor António Correia pelo apoio, constante disponibilidade e simpatia no decorrer deste processo académico.

Ao meu colega, Bruno Almeida que, sempre, auxiliou-me com todo o suporte técnico e logístico nos diversos processos de análise laboratorial do presente trabalho.

A todos os colegas do ID9, em especial à Ana e Alexandra que tanto apoiaram na troca de conhecimentos, vivências, informações e boa disposição.

À Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho, por disponibilizarem os meios logísticos e humanos, sem os quais esta investigação não seria possível.

À minha companheira de mestrado Carina Ferreira, pelo seu apoio e cumplicidade nos diversos momentos proporcionados neste processo de investigação.

Em especial agradeço, à minha família que nunca me abandonou mesmo nos momentos mais difíceis, nunca fraquejando e dando-me tudo que preciso para a conclusão deste objectivo.

Ao meu companheiro, Sérgio para qual vai todo meu afecto e quem como ninguém viveu esta viagem que tantos obstáculos tiveram que ser superados.

À minha querida filha para quem vai todo o meu amor e que, nesta fase da vida foi uma enorme alegria que a vida me deu, sendo uma motivação ao final de cada obstáculo superado.

A todos o meu sentido...
... muito obrigado!

Palavras-chave

Candida krusei, oxidase alternativa (AOX), stress oxidativo, antifúngicos, espécies reactivas de oxigénio (ROS), ácido salicilhidroxâmico (SHAM).

Resumo

Tal como *Candida albicans*, *C. krusei* está associada a infecções fúngicas invasivas em indivíduos imunodeprimidos por SIDA ou por quimioterapia. Estas infecções fúngicas invasivas têm assumido particular relevância dado que na sua grande maioria se observam casos de resistência ao fluconazol e outros azóis. Por outro lado, os mecanismos de patogenicidade de *C. krusei* não estão documentados sabendo-se que não se relacionam com os descritos para *C. albicans*.

Na mitocôndria de todas as células eucarióticas o complexo citocromo c oxidase funciona como receptor de electrões promovendo a redução final do oxigénio a água. No entanto, é sabido que em plantas e nalguns protozoários e fungos existe um complexo designado de oxidase alternativa (AOX) que aceita os electrões directamente da ubiquinona e promove a redução do oxigénio a água funcionando como um “bypass” da cadeia respiratória.

De forma a determinar qual a relevância desta via alternativa na resistência ao stress oxidativo em *C. krusei*, vários isolados clínicos com AOX foram submetidos a diferentes indutores de stress oxidativo (peróxido de hidrogénio, menadiona e plumbagina) e a dois antifúngicos o fluconazol e o voriconazol com e sem inibidor da AOX, o ácido salicilhidroxâmico (SHAM).

Os resultados mostram que o fluconazol e o voriconazol induzem a produção de ROS numa percentagem muito pequena, aproximadamente entre 0 e 10%, sugerindo que a indução de stress oxidativo não é o principal mecanismo na base do efeito fungistático destes dois antifúngicos. No entanto a inibição específica da AOX pelo SHAM resultou num aumento da percentagem de células com ROS acumulados para ambos os tratamentos. Estes dados parecem sugerir que estes antifúngicos podem, eventualmente, induzir algum stress oxidativo e que a actividade da AOX permite às células diminuir a produção de ROS, revelando o possível envolvimento desta enzima na resistência aos antifúngicos indutores de stress oxidativo. No presente estudo, a relevância da actividade da AOX na resistência ao stress oxidativo foi reforçada pelos resultados obtidos nos tratamentos com os indutores de stress oxidativo, o peróxido de hidrogénio, a menadiona e a plumbagina onde os resultados mostram que a actividade da AOX, presente nos isolados clínicos de *C. krusei*, permite diminuir a produção de ROS e muito provavelmente conferir alguma resistência a estas células. Este estudo permitiu elucidar a acção da AOX como um dos possíveis mecanismos de defesa que poderá contribuir para a resistência de *C. krusei* aos agentes antifúngicos.

Keywords

Candida krusei, alternative oxidase (AOX), oxidative stress, antifungal agents, reactive oxygen species (ROS), salicylhydroxamic acid (SHAM)

Abstract

As *Candida albicans*, *C. krusei* is associated to the invasive fungal infections in immunosuppressed patients due to AIDS or chemotherapy. These invasive fungal infections, have assumed particular relevance given the resistance of *Candida* spp cells to antifungal agents such as fluconazole and other azoles. The mechanisms underlying the resistance of *Candida* spp to azoles have been widely explored. Nevertheless, for *C. krusei* they are not well characterized although it is well known that they are not related with the ones described for *C. albicans*.

In the mitochondria of all the eukaryotic cells, the complex cytochrome c oxidase functions as an acceptor of electrons promoting the final reduction of oxygen to water. However, it is known that in higher plants and some protist and fungi, a complex named oxidase alternative (AOX), that accepts electrons directly from ubiquinone and promotes the reduction of oxygen to water, mediates a bypass of the respiratory chain. In *C. krusei* cells, in contrast to other species of *Candida*, it was detected the presence of this respiratory alternative pathway that seems to be able to produce enough energy for the metabolic activities of the cell.

To determine the relevance of this alternative pathway in the oxidative stress resistance of *C. krusei* cells, some clinical isolates presenting AOX have been submitted to different inducers of oxidative stress (hydrogen peroxide, menadione and plumbagin) and to two antifungal agents fluconazole and voriconazole, with and without an AOX specific inhibitor the salicylhydroxamic acid (SHAM). The results showed that fluconazole and voriconazole induce ROS production in a small percentage of cells, between 0 and 10%, indicating that ROS induction is not one of the main mechanisms underlying the fungistatic effect of these antifungal agents. Nevertheless, the specific inhibition of AOX with SHAM resulted in an increased percentage of cells with accumulation of ROS for the treatments with both antifungal agents. These data seem to suggest that these antifungal agents might induce, in a certain degree, oxidative stress and that the activity of the AOX allows cells to diminish the ROS production, disclosing the putative involvement of this enzyme in the resistance to oxidative stress induced by the antifungal agents. In the present study, the relevance of the AOX activity in the resistance to oxidative stress was strengthened by the results of the treatments with the inducers of oxidative stress, namely hydrogen peroxide, menadione and plumbagin. These results showed that AOX activity, present in *C. krusei* clinical isolates, allows the prevention of ROS production and most probably confers some resistance to these cells when treated with oxidative stress inducers.

This study contributes for the elucidation of AOX as a possible defence mechanism that will be able to contribute for the resistance of *C. krusei* to the antifungal agents.

Índice:

1. Introdução	- 13 -
1.1. Agentes antifúngicos	- 15 -
1.2. Resistência aos antifúngicos	- 19 -
1.3. O stress oxidativo	- 21 -
1.4. A oxidase alternativa	- 25 -
2. Materiais e Métodos.....	- 29 -
2.1. Meios e preparação de culturas	- 29 -
2.1.1. Meios de cultura e reagentes	- 29 -
2.1.2. Culturas celulares.....	- 29 -
2.1.3. Preparação das células para os tratamentos	- 30 -
2.2. Estudo da Oxidase alternativa.....	- 30 -
2.2.1. Indução de stress oxidativo	- 30 -
2.2.2. Determinação da formação de espécies reactivas de oxigénio	- 31 -
3. Resultados	- 33 -
4. Discussão.....	- 43 -
5. Conclusão	- 47 -
6. Bibliografia.....	- 49 -

Índice de figuras:

Figura 1: Constituição da parede e membrana celular dos fungos	- 15 -
Figura 2: Esquema representativo do mecanismo de acção da anfotericina B.....	- 17 -
Figura 3: Esquema representativo do mecanismo de acção dos azóis	- 18 -
Figura 4: Representação do mecanismo de acção do fluconazol e voriconazol.....	- 19 -
Figura 5: Representação dos vários mecanismos de resistência aos antifúngicos.....	- 20 -
Figura 6: Esquema representativo da produção de ROS e respectivas defesas anti-oxidantes	- 22 -
Figura 7: Organização da cadeia respiratória na mitocôndria dos fungos.....	- 26 -

Índice de quadros:

Quadro 1: Preparação do meio de Sabouraud agar Asparagina sólido.....	- 29 -
Quadro 2: Preparação do meio de Sabouraud agar Asparagina líquido.....	- 29 -
Quadro 3: Estirpes de <i>Candida krusei</i> com AOX.....	- 30 -
Quadro 4: Soluções stock dos reagentes usados	- 31 -

Índice de Painéis:

Painel 1: Imagens obtidas por microscopia de epifluorescência de células com acumulação de ROS, determinada pela emissão de fluorescência verde, para as diferentes estirpes e condições estudadas.	- 34 -
Painel 2: Percentagem de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 4072 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.	- 35 -
Painel 3: Percentagem de células de <i>Candida krusei</i> P21 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.	- 36 -
Painel 4: Percentagem de células de <i>Candida krusei</i> P24 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.	- 37 -
Painel 5: Percentagem de células de <i>Candida krusei</i> P36 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.	- 38 -
Painel 6: Percentagem de células de <i>Candida krusei</i> P83 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.	- 39 -
Painel 7: Percentagem de células de <i>Candida krusei</i> P50 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.	- 40 -
Painel 8: Percentagem de células de <i>Candida krusei</i> P51 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.	- 40 -

Lista de abreviaturas:

- 14DM – Lanosterol C14 α desmetilase
- ABC – “ATP-binding cassette”
- AOX – Oxidase alternativa
- AOX1 – Gene precursor da oxidase alternativa
- ATP – Adenosina trifosfato
- H₂O₂ – Peróxido de hidrogénio
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- MFS – Superfamília facilitadora
- MICs – Concentrações mínimas inibitórias
- NADH – Nicotinamida adenina dinucleótido
- NADPH – Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
- PAR – Cadeia respiratória paralela
- PBS – Tampão fosfato salino
- PYCC – “Portuguese yeast control collection”
- RNA – Ácido ribonucleico
- ROS – Espécies reactivas de oxigénio
- SAB – Sabouraud agar Asparagina
- SHAM – Ácido salicilhidroxâmico
- SIDA – Síndrome de imunodeficiência adquirida
- SOD – Superóxido dismutase

1. Introdução

Como as células humanas e ao contrário das bactérias, os fungos são células eucarióticas. O seu genoma está organizado num núcleo envolvido por uma membrana em continuação com o retículo endoplasmático rugoso. No interior da célula fúngica distinguem-se diferentes organelos como as mitocôndrias, ribosomas, vacúolos e inclusões.

Os fungos distinguem-se pela sua morfologia através do elemento de propagação, a hifa. Com efeito, os fungos filamentosos apresentam uma única hifa, o micélio, enquanto que os fungos unicelulares crescem em forma de levedura caracterizada pela forma de propagação através da gemulação. Quando expostos a condições adversas (temperatura, nutrientes e atmosfera) os fungos podem apresentar dimorfismo que corresponde à capacidade de crescer em forma de levedura ou de fungo filamentoso. Vários fungos patogénicos apresentam dimorfismo nomeadamente *Candida* spp.

Leveduras do género *Candida* fazem parte da flora normal do ser humano (pele, mucosas e tracto gastrointestinal) sendo por isso consideradas microrganismos comensais que se podem tornar patogénicos aquando da ruptura dos mecanismos de defesa do hospedeiro ou quando ocorre comprometimento de barreiras anatómicas secundariamente a traumatismos ou procedimentos médicos invasivos (Colombo AL, Guimarães T, 2003). As infecções por *Candida* spp envolvem um espectro amplo de micoses superficiais (pele e mucosas) e invasivas ou candidémias sistémicas que podem comprometer órgãos como resultado de disseminação hematológica (Dignani MC et al., 2003).

A ocorrência de infecções por *Candida* spp em ambiente hospitalar assumiu grande relevância a partir da década de 1980 em que houve um aumento da ordem de 400% na incidência de candidémia nos principais hospitais americanos (Beck-Sagué C et al., 1993). Tortorano AM e colegas descreveram que a frequência de candidémia apresenta valores muito semelhantes em diferentes países, variando entre 0,20-0,38 por 1000 admissões e de 3,0-4,4 por 100000 paciente/dia (Tortorano AM et al., 2004). Estas infecções estão na maioria dos casos associadas a factores de risco como infecção pelo vírus HIV ou a intervenções médicas e cirúrgicas que comprometem o sistema imune do paciente, tais como: transplantes, quimioterapia agressiva e aplicação indiscriminada de antifúngicos (Fridkin SK et al., 1996). Por outro lado, o uso de antibióticos, a própria

colonização por *Candida* spp, a hemodiálise e uso de cateter venoso central também são reconhecidos como factores de risco adicionais (Wey SB et al., 1988).

Entre as principais espécies de *Candida* de interesse clínico, *C. albicans* surge como o agente patogénico mais comum nas infecções. A virulência e/ou patogenicidade de *C. albicans*, definida como a capacidade de infectar e causar doença, está associada a diversos factores entre os quais se destacam: i) a formação de hifas que permitem à célula exercer força mecânica importante para a sua penetração nos epitélios e endotélios (Kunamoto et al., 2005) constituindo assim uma forma de propagação e consequentemente de infecção; ii) a aderência tecidual promovida pela estrutura da sua superfície celular e iii) produção de enzimas extracelulares hidrolíticas como a aspartilproteinase e fosfolipase (Naglik JR et al., 2003). No entanto, a patogenicidade de *C. albicans* será sempre um fenómeno multifactorial onde o estado imunitário do hospedeiro tem também uma função preponderante no desencadear da infecção.

Mudanças significativas na epidemiologia da candidémia foram observadas nas últimas décadas. Enquanto nos anos sessenta *C. albicans* era responsável por 85% a 90% dos episódios, nos anos noventa *C. albicans* apareceu como o agente etiológico de apenas 42% de casos de candidémia (Abi-Said D et al., 1997). Os restantes casos eram causados por espécies do género *Candida* não *albicans* com destaque para *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae* (Fridkin SK et al., 1996). As infecções por *Candida* não *albicans* assumem particular relevância primordialmente dada a sua virulência e patogenicidade em indivíduos imunocomprometidos, o que resulta numa taxa de mortalidade significativa, associada à ocorrência de resistência às drogas antifúngicas correntemente usadas (Krcmery V et al., 2002). De entre as espécies não *albicans*, *C. krusei* aparece como bastante problemática dada a sua resistência quase universal aos derivados azólicos (ex. fluconazol) e a sua reduzida susceptibilidade a outras alternativas terapêuticas (Berrouane YF et al., 1996). De facto, *C. krusei* está associada a elevada morbilidade e mortalidade em pacientes imunodeprimidos cuja resposta à anfotericina B é variável e foi descrita em pacientes previamente expostos aos azóis (Mertz WG et al., 1986). As infecções causadas por *C. krusei* estão também fortemente associadas a tratamento profiláctico com fluconazol na presença de neutropenia (Abi-Said D et al., 1997). Assim, é emergente elucidar as bases de resistência que algumas espécies *Candida* não *albicans* apresentam aos antifúngicos usados na prática clínica.

1.1. Agentes antifúngicos

Como referido anteriormente a parede celular dos fungos é maioritariamente constituída por polissacarídeos, nomeadamente o glucano, a quitina e o manano, que estão ligados a proteínas. Na membrana celular encontramos uma bicamada fosfolipídica onde distinguimos o ergosterol, alvo principal da acção dos antifúngicos (Figura 1).

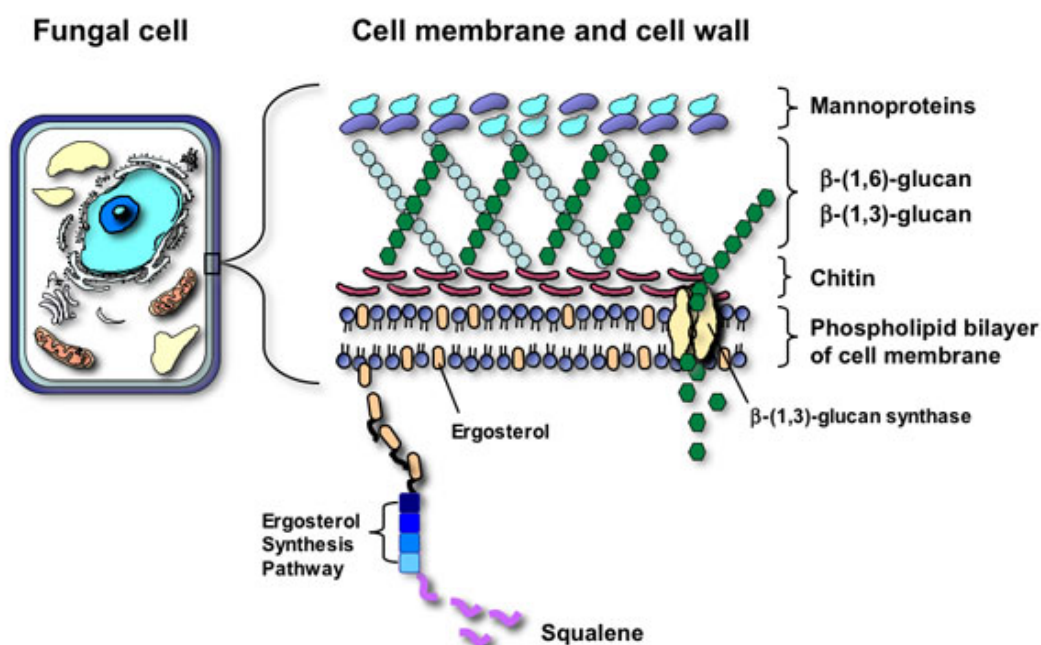


Figura 1: Constituição da parede e membrana celular dos fungos (Retirado do site www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.htm).

Os agentes antifúngicos mais comumente utilizados no tratamento de infecções por *Candida* dividem-se em várias classes de acordo com o seu mecanismo de acção: nucleósidos análogos (pirimidinas-fluorotinadas ex. 5-fluorocitosina), pneumocandinas-equinocandinas, pradimicinas-benancomicinas, nicomicinas, alilaminas e tiocarbamatos, os polienos (ex. anfotericina B, nistatina) e os azóis (ex. miconazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol e voriconazol) (Andriole VT, 1999).

Relativamente aos nucleósidos análogos, o seu mecanismo de acção consiste na inibição do metabolismo das pirimidinas, interferindo no RNA e na síntese de proteínas da

parede fúngica. A 5-fluorocitosina, um análogo da citosina, é um dos antifúngicos pertencentes a esta classe mais usados e é activa contra as espécies de *Candida* spp, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus* spp (Andriole VT, 1999).

As pneumocandinas-equinocandinas são agentes antifúngicos lipopeptídicos que actuam prevenindo a síntese da parede celular através da inibição não competitiva da 1,3- β -D-glucano-sintetase que sintetiza um componente estrutural importante da parede celular dos fungos (Denning DW, 1997). A equinocandina tem alguma eficácia contra *Candida* spp e *Aspergillus* spp (Andriole VT, 1999).

Os antifúngicos pradimicina e benanomicina ligam-se às manoproteínas da parede celular provocando a sua lise osmótica, permitindo a libertação dos componentes celulares, em particular do potássio, acabando por conduzir à morte das células. São fungicidas contra uma variedade de fungos incluindo estirpes resistentes a outros agentes antifúngicos (Andriole VT, 1999).

As nicomicinas, são inibidores competitivos das enzimas celulares que sintetizam a quitina. Estas enzimas são fundamentais para a síntese da parede celular. São potentes agentes antifúngicos contra fungos dimórficos como *Coccidioides immitis* e *Blastomyces dermatitidis* (Andriole VT, 1999).

Os alilaminas e tiocarbamatos são fungicidas sintéticos que inibem a esqualeno epoxidase, uma enzima que juntamente com a esqualeno ciclase converte o esqualeno em lanosterol que por sua vez é convertido em ergosterol. Sem este componente a estrutura e função da membrana celular é afectada levando assim à morte das células. Existem duas alilaminas – a naftifina e terbinafina – e um composto de tiocarbamatos, o talfanaftato. A naftifina é considerada um agente tópico eficaz no tratamento de infecções da pele por dermatófitos (Andriole VT, 1999).

Da classe dos polienos o mais importante representante é a anfotericina B usada há mais de 30 anos na prática clínica e que se mantém como um dos antifúngicos de escolha para o tratamento de infecções muito graves dada a sua elevada eficácia. A sua acção consiste na formação de complexos com o ergosterol levando à formação de canais membranares que permitem a passagem dos componentes citoplasmáticos, em especial iões de potássio, provocando um desequilíbrio no gradiente de protões existente entre o interior da célula e o meio exterior, acabando por conduzir à morte da célula (Figura 2) (White TC, 1998). No entanto, a anfotericina B está associada a uma elevada toxicidade o que limita o seu uso. O fungizone, detergente utilizado na solubilização da anfotericina B,

tem muitos efeitos secundários indesejáveis no doente e é o grande responsável pela toxicidade do tratamento (Brajtburg J, Bolard J, 1996).



Figura 2: Esquema representativo do mecanismo de acção da anfotericina B (Retirado www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.htm).

A actividade fungistática de todos os azóis baseia-se na inibição da enzima lanosterol C14 α desmetilase (14DM) dependente do complexo citocromo p450 dos fungos (Figura 3). A sua inibição vai impedir a conversão de lanosterol em ergosterol, depleção de ergosterol, acumulação de precursores e perda da integridade da membrana fúngica (Fica AC, 2004) (Ghannoum MA et al., 1999). A depleção de ergosterol, principal elemento estrutural da membrana, altera o fluxo na membrana através da redução da actividade de diferentes enzimas ligadas à membrana (como a quitina sintetase, ou enzimas do metabolismo lipídico e de processos oxidativos) e aumento da sua permeabilidade (Polak A, 2003). Em simultâneo com a inibição da actividade do complexo citocromo p450, os azóis podem inibir a citocromo oxidase e diferentes peroxidases. Por outro lado, a inibição da 14DM resulta também na acumulação de um esteroide metilado que inibe o crescimento celular (Figura 3) (Morschhäuser J, 2002). Dentro dos azóis distinguimos os triazóis constituídos por um anel de azole de cinco átomos onde três são de nitrogénio (Fica AC, 2004) (Chiou CC et al., 2000). O fluconazol é um triazol com largo espectro de acção para as infecções fúngicas por dermatófitos, fungos patogénicos e oportunistas como *Cryptococcus neoformans* e *Candida* spp e por isso muito usado na prática clínica.

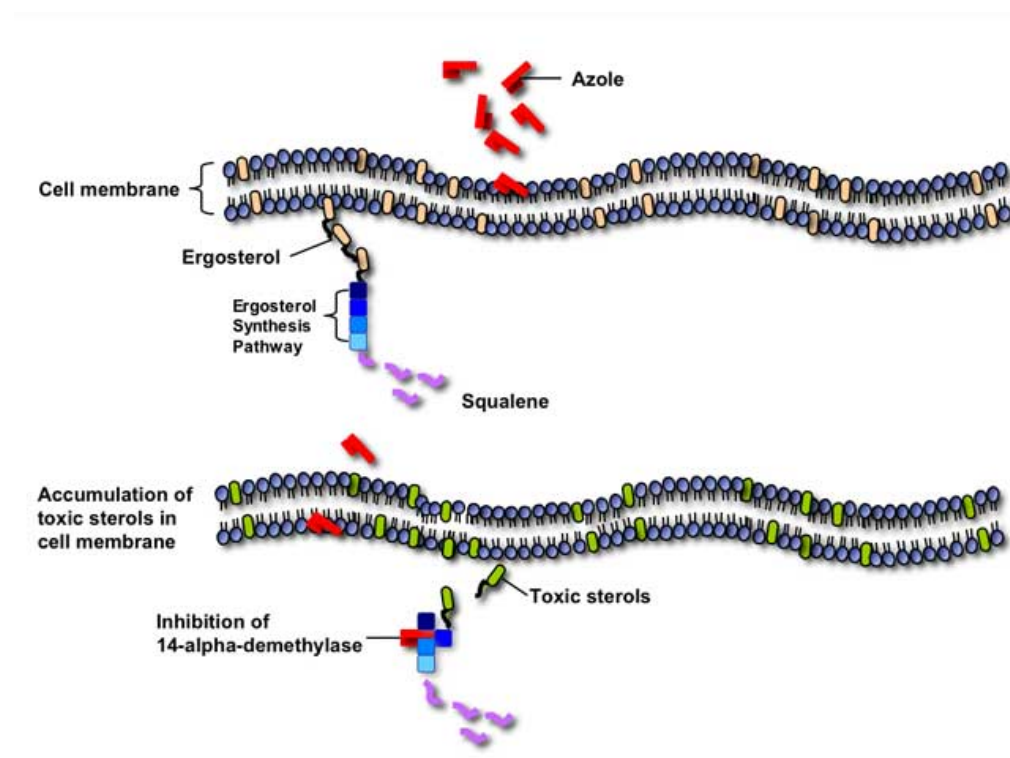


Figura 3: Esquema representativo do mecanismo de acção dos azóis (Retirado www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.htm).

As espécies *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* apresentam alta sensibilidade enquanto que *C. krusei* e *C. glabrata* são resistentes a esta droga (Charlier C et al., 2006) (Lothoraly O et al., 1997). Considerado o tratamento de escolha em pacientes neutropénicos, com maior penetração no sistema nervoso central, tem-se demonstrado eficaz nas candidíases orais em pacientes com SIDA ou com transplantes (Brun S et al., 2003).

Dado os diversos casos de resistência ao fluconazol que surgiram nos últimos anos, foram recentemente desenvolvidos novos triazóis para uso sistémico, tais como: o voriconazol, o posaconazol e ravuconazol. O uso de voriconazol tem aumentado consideravelmente dada a sua eficácia no tratamento de infecções fúngicas em imunodeprimidos com aspergilose e candidíases invasivas por estirpes resistentes como *C. krusei* (Canuto MM et al., 2002). O seu modo de acção é semelhante ao de todos os azóis, no entanto, o voriconazol também inibe a enzima 24-metileno dihidrolanosterol desmetilase o que pode explicar a sua elevada eficácia (Figura 4) (Sanati H et al., 1997) (Fica AC, 2004).

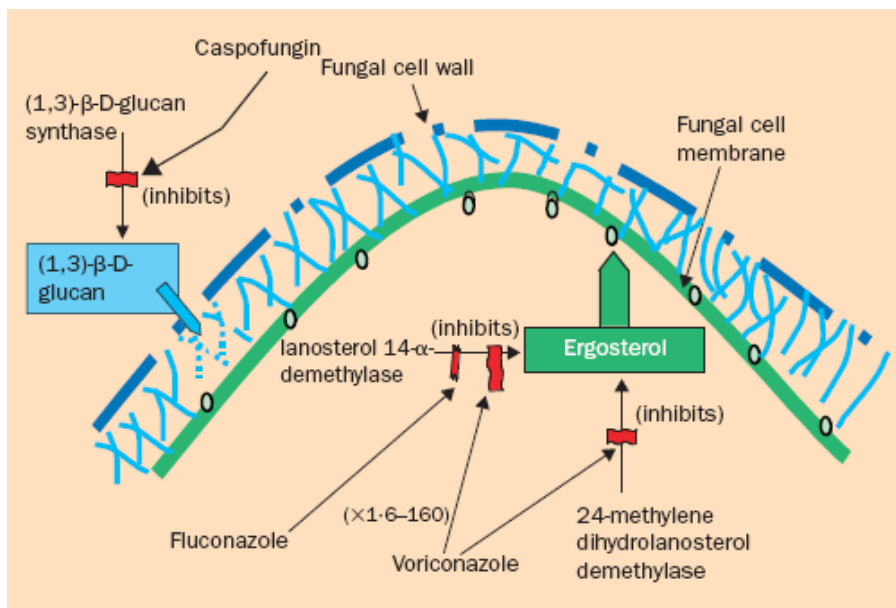


Figura 4: Representação do mecanismo de acção do fluconazol e voriconazol (Retirado de Mar Masiá Canuto e Félix Gutiérrez Roderro, 2002).

1.2. Resistência aos antifúngicos

Até 1980 o aparecimento de estirpes de *Candida* resistentes aos azóis era um fenómeno raro (White TC, 1998). No entanto, nos últimos anos observou-se o aparecimento de isolados clínicos resistentes em pacientes imunodeprimidos durante o tratamento contínuo ou intermitente de candidíases orais com fluconazol (White TC, 1998).

A resistência aos antifúngicos pode ser natural ou adquirida. A resistência natural corresponde à predisposição do fungo em apresentar uma resistência genética perante o antifúngico, assim, devido a factores genéticos certas drogas podem ser ineficazes contra certas estirpes. Como exemplo temos a ineficácia do fluconazol perante as estirpes de *C. krusei* e *C. norvegensis* por serem fungos com resistência intrínseca ou inerente (Marichal P et al., 1995) (Sandven P et al., 1997).

A resistência adquirida revela-se durante a exposição ao antifúngico, como é o caso da resistência de *Candida albicans* aos azóis, inicialmente sensíveis mas devido ao uso intensivo de fluconazol tornam-se resistentes. Processos genéticos como mutações e selecções são responsáveis por estas alterações a nível da célula fúngica.

Os mecanismos envolvidos no processo de resistência a antifúngicos são ainda pouco compreendidos. No entanto, alguns mecanismos de resistência foram descritos em várias espécies patogénicas, nomeadamente a alteração na captura da droga, na enzima alvo, nas enzimas da síntese de ergosterol e finalmente a presença de bombas de efluxo na célula fúngica (White TC, 1998) (Figura 5).

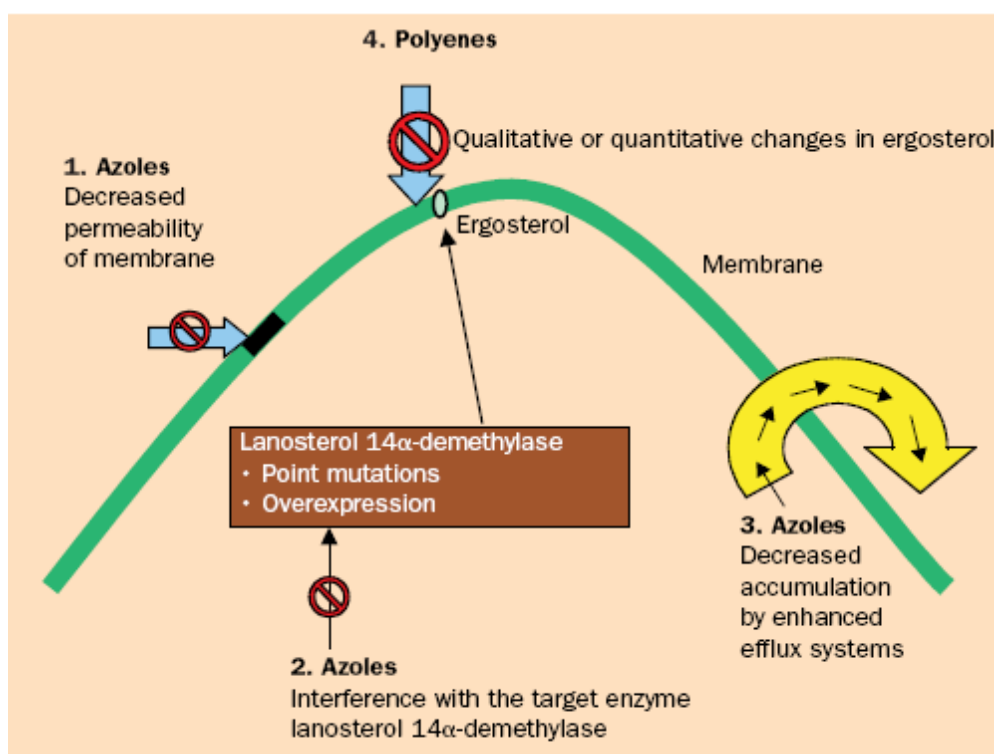


Figura 5: Representação dos vários mecanismos de resistência aos antifúngicos (Retirado de Mar Masiá Canuto e Félix Gutiérrez Rodero, 2002).

Por detrás de todas estas fenómenos, podem estar alterações na composição de esterol na membrana plasmática do fungo (White TC, 1998). Vários estudos demonstraram que durante a eliminação ou redução de ergosterol, aparecem novos compostos como o 14 α -metil esterol que altera a permeabilidade e o fluxo da parede fúngica. Estas alterações baixam a capacidade de entrada dos azóis no interior da célula (White TC, 1998). Também a alteração na composição dos fosfolípidos da membrana pode influenciar a entrada de drogas, segundo Mago e Khuller a modificação dos fosfolípidos e ácidos gordos de *C. albicans* afecta a permeabilidade da célula tornando-a mais resistente ao miconazol (Mago N, Khuller GK, 1989). A modificação quantitativa ou qualitativa da lanosterol C14 α desmetilase está implicada nos processos de resistência aos

azóis (White TC, 1998). Certas alterações genéticas nomeadamente mutações, "overexpression" ou amplificação do respectivo gene estão associadas a alteração da 14 α desmetilase diminuindo a eficiência da ligação ao antifúngico. Também outras enzimas da via de síntese de ergosterol podem sofrer modificações que levam ao aparecimento de fenómenos de resistência. Alterações a nível dos genes codificadores destas enzimas comprometem a síntese de ergosterol e consequentemente induzem resistência devido a alterações da parede fúngica. Está descrito que lesões a nível da enzima C-5 desaturase vão implicar a acumulação de 14 α -metil-fecosterol no lugar de ergosterol (Ghannoum MA, Rice LB, 1999) e consequentemente resistência aos azóis (por redução de permeabilidade) e aos polienos (por ausência de ergosterol).

Por último, a redução da concentração intracelular dos antifúngicos devido ao efluxo activo é um processo com muita importância nos mecanismos de resistência. Na literatura estão descritos dois sistemas de efluxo nos fungos, um devido a proteínas que pertencem à principal superfamília facilitadora (MFS) e outro à superfamília de proteínas "ATP-binding cassette" (ABC) (Ghannoum MA, Rice LB, 1999). As ABC estão associadas ao efluxo activo de moléculas consideradas tóxicas para a célula e que são relativamente hidrofóbicas ou lipofílicas como é o caso da maioria dos azóis (White TC, 1998). A perda da droga do interior da célula a partir das MFS efectua-se a partir da diferença de gradiente em concentração de protões a nível da membrana, os protões são bombeados para o interior da célula enquanto que as moléculas, os antifúngicos, são bombeadas para o exterior (White TC, 1998).

Além dos vários mecanismos de resistência descritos, existe uma via "by pass" para compensar a perda de funções enzimáticas devido à actividade das drogas antifúngicas. Segundo Wood e Hollomon a oxidase alternativa localizada na mitocôndria provoca a resistência ao fungicida strobilurin devido à activação desta via alternativa na cadeia respiratória (Wood PM et al., 2003). Apesar da sua função ser ainda pouco conhecida é de todo o interesse estudar a oxidase alternativa no processo de resposta ao stress oxidativo mediado por várias substâncias nomeadamente os antifúngicos.

1.3. O stress oxidativo

Define-se o stress oxidativo nas células como consequência de certos mecanismos nomeadamente o aumento na geração de oxidantes, a diminuição da

protecção por parte dos antioxidantes ou a falha na reparação dos danos oxidativos. Estes danos são induzidos pelas espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Figura 6).

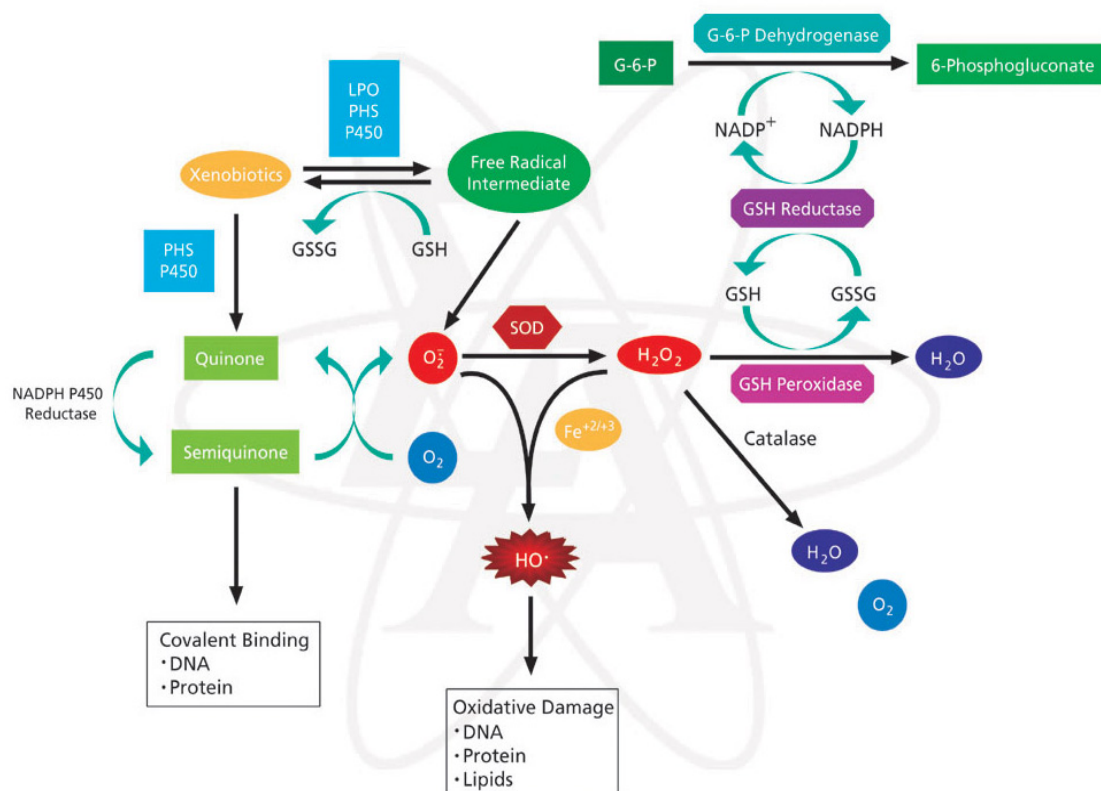


Figura 6: Esquema representativo da produção de ROS e respectivas defesas anti-oxidantes (Retirado do site www.sigmaaldrich.com)

As ROS como o peróxido de hidrogénio, o anião superóxido e o radical hidroxilo são gerados em todas as células durante o decurso normal da actividade metabólica. A sua produção resulta dos produtos do metabolismo aeróbio nos microrganismos onde o principal organelo precursor é a mitocôndria (Kobayashi D et al., 2002). Nos processos respiratórios, reacções com enzimas oxidativas e oxigénio molecular podem gerar o anião superóxido e esta mesma molécula pode dar origem a mais componentes reactivos como o peróxido de hidrogénio e radicais hidroxilos (Miller RA, Britigan BE, 1997). Sendo a mitocôndria considerada a principal fonte de anião superóxido nas células, estudos revelaram que o complexo III da cadeia respiratória pode ser responsável por mais de 80% das ROS produzidas nos fungos (Boveris A et al., 1982).

As ROS têm que ser eficazmente eliminadas porque promovem o ataque aos principais componentes celulares como os ácidos nucleicos, proteínas e lípidos (Grant CM

et al., 1997) (Morada-Ferreira e Costa, 2000), provocando danos como a inactivação de enzimas, alteração da permeabilidade da membrana e mutações (Costa V et al., 2001) que podem conduzir à morte celular (Maxwell DP et al., 1999).

A produção de ROS também é uma estratégia comumente utilizada pelo sistema imune para eliminar os microrganismos patogénicos. De facto, as células fagocitárias são a principal fonte de stress oxidativo para os fungos patogénicos aquando da fagocitose (Westwater C, et al., 2005). Neste processo os neutrófilos e macrófagos desencadeiam reacções oxidativas a partir do complexo enzimático NADPH-oxidase que vai reduzir o oxigénio dos fagossomas em ROS - peróxido de hidrogénio e anião superóxido - causando stress oxidativo nos patogénicos (Missall TA et al., 2004).

O peróxido de hidrogénio enquanto ROS, resulta do processo de dismutação do anião superóxido, apresenta pouca toxicidade mas reage com o ferro e o cobre na forma reduzida produzindo radicais hidroxilo altamente tóxicos. Nos fungos tem a capacidade de iniciar a peroxidação de lípidos e consequentemente a ocorrência de danos na membrana.

A acção de certos antifúngicos também pode originar a formação de ROS nomeadamente o miconazol, um azole, inibidor da síntese de ergosterol, e os polienos a anfotericina, a nistatina e a nifimicina, que interagem com o ergosterol da membrana fúngica causando a sua permeabilização e a produção de ROS nas espécies sensíveis (Aerts AM et al., 2007). Kobayashi e seus colaboradores demonstraram que o miconazol induz um efeito citostático em células de *C. albicans*, e observaram que além da saída do ATP intracelular, a inibição da actividade da ATPase pelo miconazol promove a produção intracelular de ROS (Kobayashi D et al., 2002). Nesta mesma pesquisa foi observado que o fluconazol também induz a produção de ROS embora em menor extensão pois segundo Odds e colaboradores, este antifúngico não interfere com a concentração de ATP em *C. albicans* (Odds FC et al., 1986). O efeito do miconazol ao nível do citoesqueleto da actina também pode promover o stress oxidativo. De facto, segundo Gourlay e colaboradores, nos fungos a actina tem um papel fundamental na actividade da mitocôndria e na regulação da formação de ROS endógenos (Gourlay CW et al., 2006). Assim, a conhecida acção do miconazol na estrutura da actina pode provocar a produção de ROS e a morte celular (Thevissen K et al., 2007).

As células fúngicas que entram em apoptose ou em processo de morte celular programada apresentam vários marcadores característicos que incluem a produção de ROS endógeno (Madeo F et al., 1999). Compostos antifúngicos como a pradimicina A (Hiramoto F, et al., 2003), a proteína osmotina (Narasimhan ML, et al., 2001), a proteína

PAF produzida por *Penicillium chrysogenum* (Leiter E, et al., 2005) e a anfotericina B (Phillips AJ et al., 2003) têm a capacidade de induzir a apoptose em células fúngicas muito provavelmente utilizando as ROS como mediadores e efectores deste processo (Aerts AM et al., 2007).

Existem também moléculas oxidantes como a menadiona e a plumbagina com a capacidade de induzir a produção de ROS (Chen JW et al., 2006) através da acção directa na cadeia respiratória das células eucarióticas. O efeito citotóxico da menadiona (2-metil-1,4-naftoquinona) resulta na redução de um electrão dos radicais da semi-quinona com oxigénio molecular produzindo o anião superóxido e outras ROS causando stress oxidativo (Wróbel M et al., 2007). Por outro lado a plumbagina (5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona) possui actividade antibacteriana, antifúngica, anti-cancerígena e anti-mutagénica e o seu efeito tóxico não resulta apenas da produção de ROS mas também da inibição da enzima NADH desidrogenase como descrito na bactéria *Escherichia coli* (Imlay et al., 1992).

Como todos os organismos aeróbios expostos a ROS, os fungos sintetizam e activam enzimas antioxidantes – superóxido dismutase (SOD), catalase e outras peroxidases – e metabolitos não enzimáticos – trealose, manitol e melanina – contra o stress oxidativo (Missall TA et al., 2004). A superóxido dismutase é uma enzima que converte o superóxido em oxigénio e peróxido de hidrogénio, consequentemente a catalase, uma peroxidase, degrada o peróxido de hidrogénio em oxigénio e água (Missall TA et al., 2004) (Figura 6).

Como já referido, os fungos apresentam vários mecanismos de resposta aos danos provocados pelos oxidantes sejam eles de origem intracelular, devido aos produtos do metabolismo celular, ou extracelular isto é do meio circundante. Assim, a sobrevivência dos fungos patogénicos e consequentemente a sua virulência, vão depender da capacidade da célula fúngica em manter os níveis intracelular de ROS. A manutenção deste equilíbrio vai permitir a sobrevivência do próprio fungo e consequentemente a resposta adequada ao stress oxidativo durante o processo de patogenia. Como mencionado na secção anterior existe outro processo para proteger a célula fúngica contra o stress oxidativo. De facto, existe ao nível da cadeia respiratória, de certos fungos, uma via alternativa promovida pela oxidase alternativa, que vai compensar a perda de funções respiratórias enzimáticas provocadas por substâncias antifúngicas.

1.4.A oxidase alternativa

Nos organismos eucariontes a energia necessária para o crescimento, o desenvolvimento, reprodução e resposta ao stress é adquirida através do ATP sintetizado através da energia protomotriz criada durante a respiração mitocondrial isto é na cadeia respiratória, onde a citocromo *c* oxidase actua como uma oxidase terminal na recepção de electrões convertendo o oxigénio em água.

Dentro da cadeia respiratória pode existir uma outra via respiratória mediada pela oxidase alternativa (AOX) que é uma enzima mitocondrial encontrada nas plantas (Moore AL, Siedow JN, 1991), nas algas (Dinant M et al., 1998), nos fungos dimórficos (Johnson CH et al., 2003), fungos filamentosos (Kirimura K et al., 1999) e em certos protozoários (Chaudhuri M et al., 1996; Jarmuszkiewicz W et al., 1998) mas que nunca foi isolada nos mamíferos (Joseph-Horne et al., 2001). É uma oxidase terminal, ciano-resistente, onde os electrões da ubiquinona são transferidos directamente para a AOX, como no citocromo *c* redutase (complexo III) da cadeia mitocondrial de transporte de electrões. Esta enzima à semelhança do citocromo *c* oxidase (complexo IV) reduz o oxigénio em água através do transporte de dois electrões (Figura 7). A expressão do gene *AOX1* é influenciada por várias situações de stress ou por factores que vão inibir o fluxo de electrões na cadeia respiratória (Vanlerberghe GC et al., 1997). A indução da AOX pode ocorrer na presença dos inibidores convencionais da cadeia respiratória, nomeadamente do complexo III e IV, como a antimicina A ou o cianeto respectivamente, daí a sua terminologia ciano-resistente (Helmerhorst EJ et al., 2002) mas é inibida especificamente pelo ácido salicilhidroxâmico (SHAM) (Schonbaum GR et al., 1971). A AOX segundo vários autores terá uma função metabólica (Vanlerberghe GC, et al., 2002) e antioxidante (Papa S, et al., 1997). Ambas as funções são potenciais factores de virulência na patogénese dos fungos (Missall TA et al., 2004).

Recentes estudos em fungos como *Cryptococcus neoformans* demonstraram que a transferência das células fúngicas de 25°C para 37°C induzia o aumento da expressão do gene *AOX1*, sugerindo então que aumento da actividade da AOX faz parte de um processo generalizado em resposta ao stress (Steen BR, et al., 2002; Akhter S, et al., 2003). Também foi observado que em resposta às alterações das condições ambientais ou por necessidades energéticas, *C. albicans* em comum com outros fungos expressa a AOX (Siedow JN et al., 2000; Joseph-Horne et al., 2001).

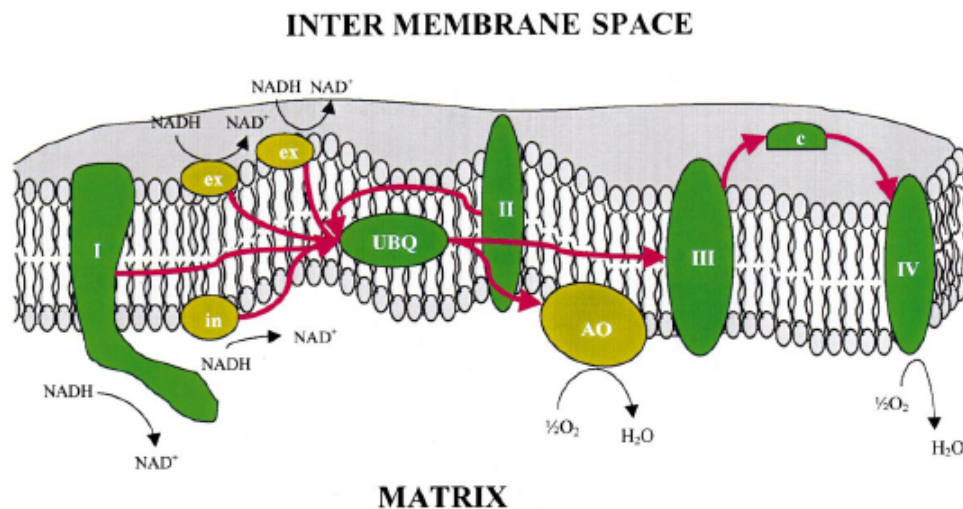


Figura 7: Organização da cadeia respiratória na mitocôndria dos fungos: o complexo I, NADH desidrogenase; complexo II, succinato desidrogenase; complexo III, ubiquinol-citocromo *c*; complexo IV, citocromo oxidase; AOX, oxidase alternativa; *c*, citocromo *c*; Q, ubiquinona; QH₂, ubiquinol; e as NAD(P)H desidrogenase interna e externas (Retirado Tim Joseph-Horne, Derek W. Hollomon e Paul M. Wood, 2001).

Como já foi referido, a expressão da AOX é influenciada por situações de stress e por factores que vão inibir o fluxo de electrões nos citocromos da via respiratória (Vanlerberghe GC, et al., 1997). Outros autores também demonstraram que nas plantas, baixas temperaturas, choque osmótico, senescência e o peróxido de hidrogénio activam a respiração ciano-resistente (McIntosh L, 1994).

As ROS parecem ser um importante indutor da expressão de AOX. De facto, em células de plantas ou fungos quando aumenta a produção do radical anião superóxido e peróxido de hidrogénio ocorre um aumento da respiração ciano-resistente (Minagawa N et al., 1992; Wagner AM, 1995; Wagner AM e Moore AL, 1997). Também a inibição da expressão da AOX está associado à formação de ROS (Popov VN et al., 1997) e à morte celular programada (Vanlerberghe GC et al., 2002) pressupondo o possível papel da AOX na protecção das células contra os danos oxidativos.

Como já mencionado, fungos como *C. albicans* (Huh WK et al., 2001) e *C. neoformans* apresentam (Akhter S et al., 2003) a AOX e vários autores sugerem que a presença desta via alternativa pode ter um papel importante na virulência destes microrganismos, uma vez que ela contribui para a produção alternativa de energia aquando da exposição a várias situações de stress.

Nos fungos patogénicos, como *C. albicans* a expressão de AOX pode ter relevância clínica (Helmerhorst EJ et al., 2005) visto que sua flexibilidade de adaptação às alterações do meio circundante está relacionada com a indução desta via alternativa. Durante a resposta imunitária numa infecção fúngica, os macrófagos reduzem o oxigénio em superóxido que é convertido pela SOD em peróxido de hidrogénio, estas ROS são indutores da AOX, logo a sua expressão não vai depender exclusivamente da produção de ROS por parte do fungo mas também dos níveis letais de ROS produzidos pelos neutrófilos e macrófagos aquando da fagocitose. Em suma, a AOX pode ter um papel crucial na defesa do fungo contra o sistema imunitário do hospedeiro.

Como *C. albicans*, *C. parapsilosis* também apresenta AOX (Guérin M et al., 1986) e vários autores associam a sua resistência às drogas devido à presença de dois tipos de vias alternativas, a AOX e uma segunda cadeia respiratória paralela (PAR) constituída por vários complexos (Milani G et al., 2001). Segundo um estudo não publicado, Oliveira S e colaboradores demonstraram a presença da AOX em *C. krusei* e *C. parapsilosis* após exposição de várias espécies de *Candida* ao stress oxidativo com e sem ácido salicilhidroxâmico. Quanto a *C. parapsilosis* já é conhecida a ligação entre a sua resistência aos antifúngicos e a presença da AOX (Milani G et al., 2001), mas em relação a *C. krusei* é importante entender o impacto da AOX na sua resistência ao stress oxidativo provocado pelos antifúngicos e a sua adaptação energética quando exposta a stress oxidativo.

O presente estudo teve como objectivo determinar qual a relevância da AOX na resistência ao stress oxidativo. Para tal, foram utilizados isolados clínicos de *C. krusei* previamente descritos como possuindo a actividade de AOX (Oliveira S e colaboradores, trabalho não publicado) que foram submetidos a diferentes indutores de stress oxidativo (peróxido de hidrogénio, menadiona e plumbagina) entre os quais alguns antifúngicos (fluconazol e voriconazol). De modo a verificar o comportamento dos fungos com e sem via alternativa os tratamentos foram efectuados com e sem inibidor, o ácido salicilhidroxâmico. Para poder comparar a reacção ao stress oxidativo por parte das estirpes de *C. krusei*, também foi submetida aos mesmos tratamentos, uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* sem actividade de AOX.

2. Materiais e Métodos

2.1. Meios e preparação de culturas

2.1.1. Meios de cultura e reagentes

Sabouraud agar Asparagina – SAB

O SAB é um meio utilizado para as culturas de *Candida* spp e para *Saccharomyces* spp. Pode ser usado em meio sólido (quadro 1) e em meio líquido (quadro 2). Uma vez preparados são autoclavados 20 minutos a 121°C, 15 psi num ciclo húmido e armazenados a 4°C.

Reagente	Referência	Quantidade
Sabouraud agar	BBL-BD (DIFCO) 211584	65 g
L-asparagina	Sigma A0884	1,4 g
Vol. final (H ₂ O dest)		1000 ml

Quadro 1: Preparação do meio de Sabouraud agar Asparagina sólido

Reagente	Referência	Quantidade
Sabouraud broth	BBL-BD (DIFCO) 238230	30 g
L-asparagina	Sigma A0884	1,4 g
Vol final (H ₂ O dest)		1000 ml

Quadro 2: Preparação do meio de Sabouraud agar Asparagina líquido

Solução tampão: Phosphate Buffered Saline – PBS

Para a preparação da suspensão celular e para os tratamentos foi usado o PBS (Sigma-Aldrich) a um pH de 7,4 e esterilizado por filtração com uma membrana de porosidade de 0,22 µm. Posteriormente foi armazenado a 4°C.

2.1.2. Culturas celulares

Neste estudo foram utilizados seis isolados clínicos de *Candida krusei* que foram previamente determinados como tendo AOX presente (cedidos pelo serviço de Microbiologia do Hospital de São João do Porto – Quadro 3) e uma estirpe de *Saccharomyces cerevisiae* 4072 cedida pelo Portuguese yeast control collection (PYCC).

Estirpes	Origem
<i>C.krusei</i> P21	Vaginal
<i>C.krusei</i> P24	Vaginal
<i>C.krusei</i> P36	Vaginal
<i>C.krusei</i> P50	Vaginal
<i>C.krusei</i> P51	Vaginal
<i>C.krusei</i> P83	Vaginal

Quadro 3: Estirpes de *Candida krusei* com AOX

2.1.3. Preparação das células para os tratamentos

Para cada tratamento a cultura celular foi repicada em placas de Petri com meio de SAB e incubada a 30°C durante 24 horas. De seguida foi preparado um inóculo em meio líquido de SAB que cresceu a 35°C durante 16 horas numa incubadora orbital a 150 rpm, para atingir a fase exponencial tardia (Oliveira S. trabalho não publicado).

No fim das 16 horas de crescimento as células foram submetidas a um processo de centrifugação durante 15 minutos a 4000 rpm e o “pellet” ressuspendido em tampão PBS. Para todos os tratamentos foi preparada uma suspensão com a concentração de 10^7 células/ml em PBS.

2.2. Estudo da Oxidase alternativa

2.2.1. Indução de stress oxidativo

Com o objectivo de estudar a influencia da AOX na indução de stress oxidativo em *C. krusei*, as suspensões celulares com 10^7 células/ml em PBS foram tratadas com os indutores de stress oxidativo a partir de soluções stock (Quadro 4) num volume total de 10ml, com 0,4 mM de H_2O_2 , 3µM de Plumbagina, 0,5 mM de Menadiona, 1µg/ml de Voriconazol, 85µg/ml e 1µg/ml de Fluconazol para *Candida krusei* e *Saccharomyces cerevisiae* respectivamente e durante 15, 30 e 60 minutos a 35°C numa incubadora orbital a 150 rpm protegidos da luz. As concentrações dos vários oxidantes correspondem às concentrações mínimas inibitórias (MICs) para as estirpes em estudo (Oliveira S. trabalho não publicado).

Reagente	Referência	Concentração stock	Solventes
Peróxido de hidrogénio	Merck	30% (V;V)	H ₂ O pura
Plumbagina	Sigma-Aldrich	100mM	Etanol a 96%
Menadiona	Sigma-Aldrich	100mM	Etanol a 96%
Fluconazol	Diflucan	2mg/ml	-----
Voriconazol	Pfizer-Groton	6,4 mg/ml	DMSO (Sigma-Aldrich)
SHAM	Sigma-Aldrich	200mM	DMSO (Sigma-Aldrich)

Quadro 4: Soluções stock dos reagentes usados

Estes tratamentos foram repetidos com pré-incubação durante 30 minutos com 3,2 mM de SHAM inibidor da AOX como descrito anteriormente.

Para efeito de controlo as células foram submetidas ao mesmo processo sem indutores de stress oxidativo e na presença ou ausência de SHAM.

2.2.2. Determinação da formação de espécies reactivas de oxigénio

Para a detecção de ROS foi usado a Dihidrorodamina 123 (Molecular Probes), um composto não fluorescente que em contacto com as ROS é oxidado a Rodamina 123 exibindo assim fluorescência verde.

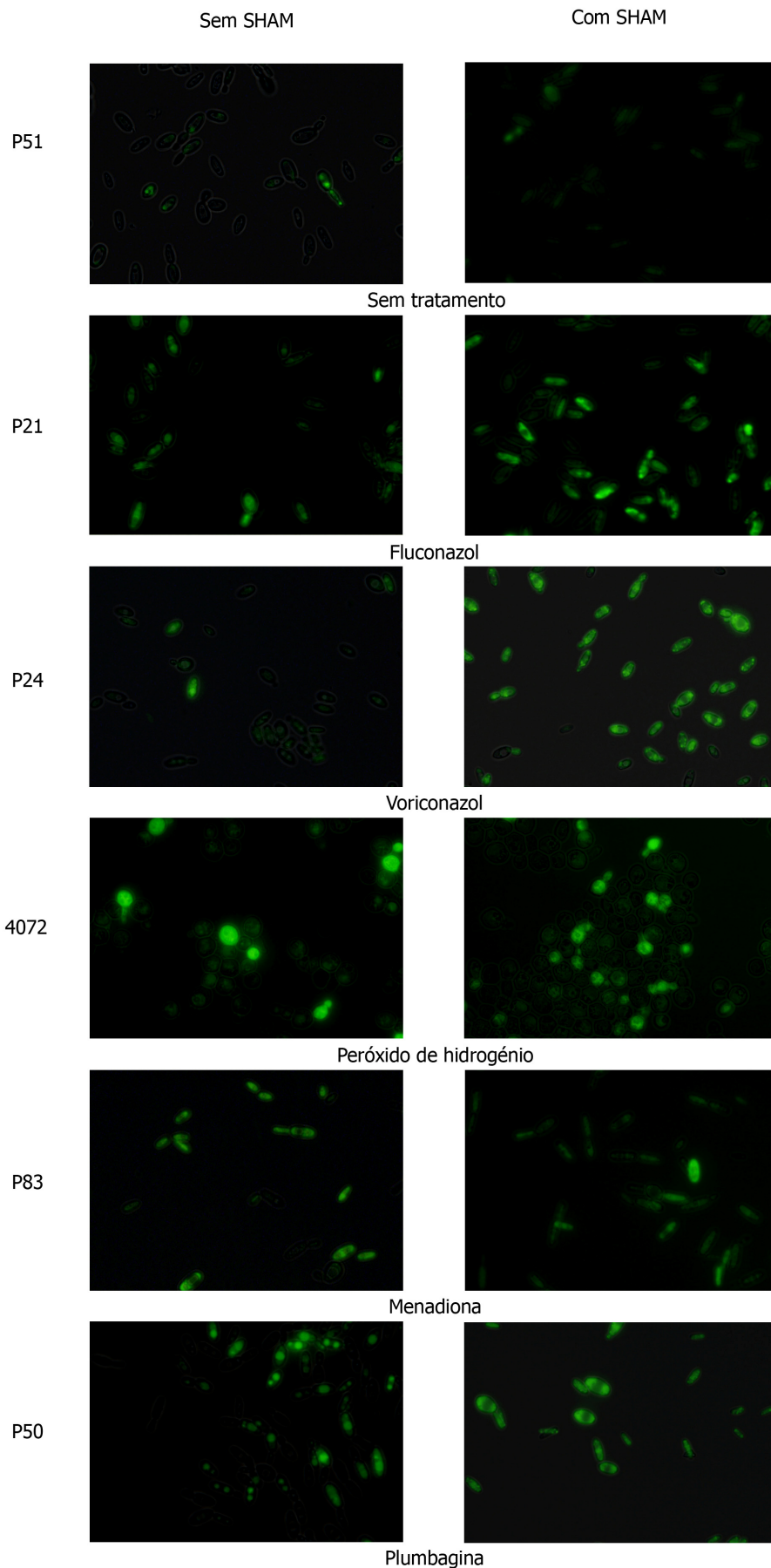
Para este efeito, ao fim de cada tempo de exposição aos indutores de stress oxidativo, as células foram recolhidas num volume de 500µl e centrifugadas a 13000 rpm durante 4 minutos. O "pellet" foi ressuspendido em 500µl de tampão PBS e novamente centrifugado. Após este processo de lavagem o "pellet" foi novamente ressuspendido em 492,5µl de tampão PBS e juntou-se 7,5µl de Dihidrorodamina 123 (Stock 1mg/ml – Molecular Probes) de modo a ficar a uma concentração final de 15µg/ml. As células foram incubadas 90 minutos a 30°C numa incubadora orbital a 150 rpm protegidas da luz. Findo este tempo de exposição, as células foram submetidas ao mesmo processo de lavagem descrito anteriormente 3 vezes. No final das lavagens o "pellet" foi ressuspendido em 5µl de PBS e a suspensão celular colocada entre lâmina e lamela para observação por microscopia de epifluorescência.

Afim de determinar a percentagem de células com acumulação de ROS nos diferentes tratamentos com os vários indutores de stress oxidativo, as preparações entre lâmina e lamela foram observadas num microscópio de epifluorescência Olympus BX61 equipado com uma camera digital DP70 de alta resolução na objectiva de 40.

3. Resultados

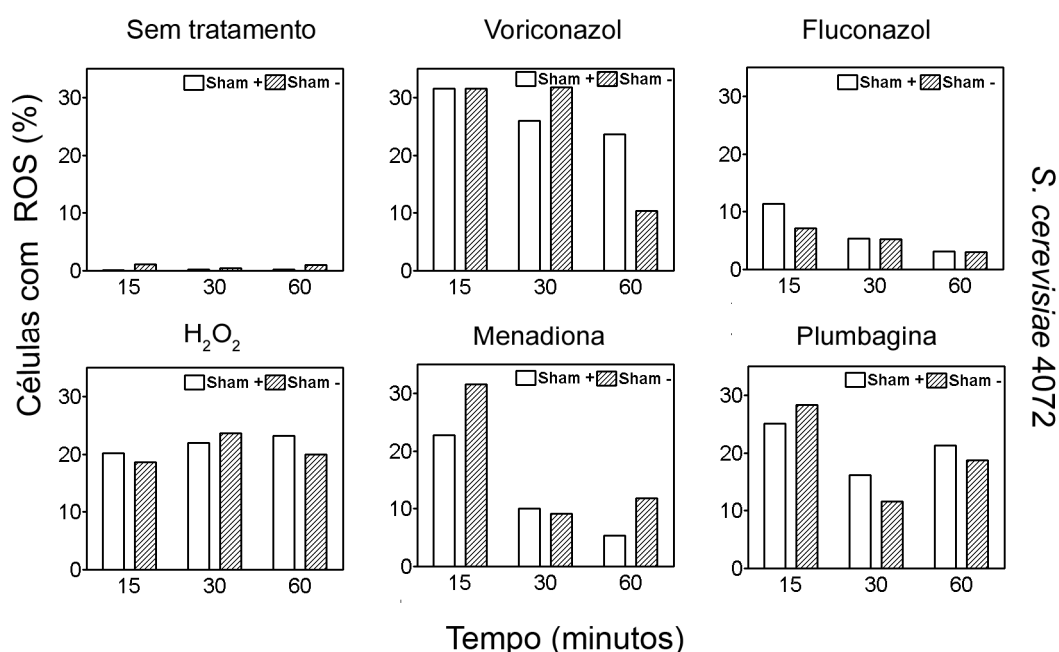
Tendo como objectivo explicar a contribuição da oxidase alternativa (AOX) na resistência a antifúngicos azólicos apresentada por estirpes *Candida krusei* e sendo conhecido que estes antifúngicos podem induzir stress oxidativo com acumulação intracelular de espécies reactivas de oxigénio (ROS) (Kobayashi D et al., 2002), os níveis de ROS foram avaliados em 6 isolados clínicos classificados como *C. krusei*, apresentando actividade da AOX e comparados com *Saccharomyces cerevisiae* como controlo de levedura sem AOX. De forma a elucidar a contribuição desta via alternativa, a detecção de ROS foi efectuada na presença e ausência de ácido salicilhidroxâmico (SHAM) um inibidor específico da actividade da AOX (Schonbaum GR et al., 1971). Como controlo os níveis de ROS foram avaliados em células não sujeitas a qualquer tratamento o que permitiu assegurar a especificidade do método de detecção das ROS. De facto, como se ilustra no painel 1, a utilização da sonda fluorescente dihidrorodamina 123 permite detectar, através da emissão de fluorescência verde, as células que apresentam acumulação de ROS após o tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo. Foram testados dois agentes antifúngicos azólicos, o fluconazol e o voriconazol e peróxido de hidrogénio, menadiona e plumbagina, descritos como indutores de stress oxidativo e portanto que geram a acumulação intracelular de ROS. Todos os agentes foram testados nas concentrações que foram previamente determinadas como sendo concentrações mínimas inibitórias (MICs).

A análise global dos resultados permitiu detectar alguma variabilidade quanto à resposta ao stress oxidativo nas diferentes estirpes de *Candida* estudadas. Esta diferença na percentagem de células com acumulação de ROS após tratamento com os indutores de stress oxidativo reflecte a especificidade de cada estirpe enquanto isolado clínico.



Painel 1: Imagens obtidas por microscopia de epifluorescência de células com acumulação de ROS, determinada pela emissão de fluorescência verde, para as diferentes estirpes e condições estudadas.

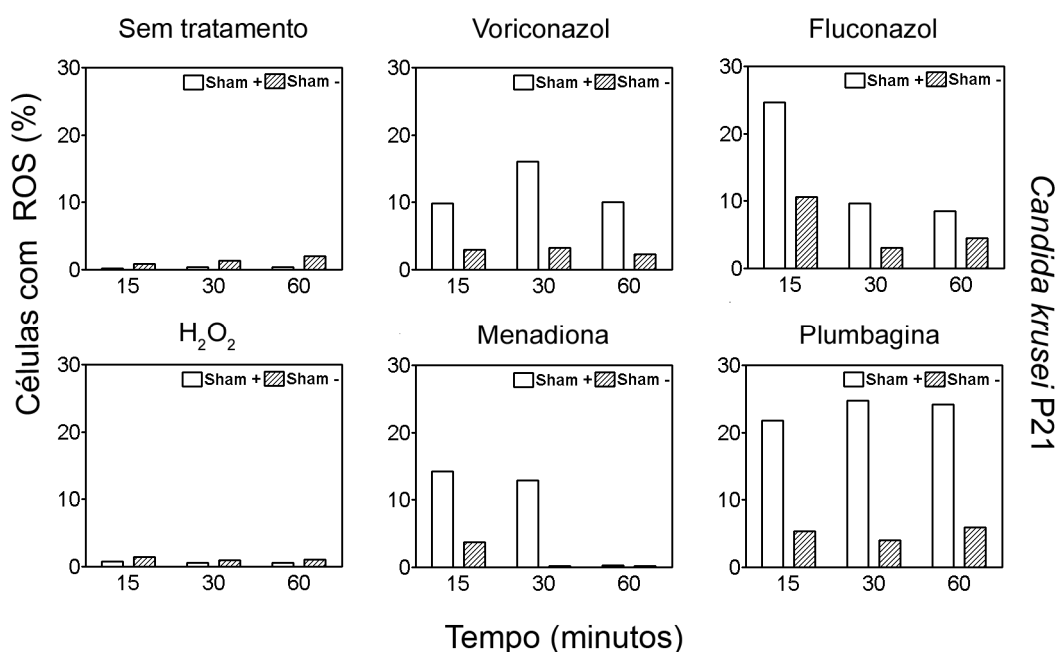
Conforme referido anteriormente, *Saccharomyces cerevisiae* 4072 foi usada como controlo negativo da presença de actividade da AOX. Observando todos os gráficos (Painel 2) podemos constatar que o comportamento das células permanece sensivelmente inalterado independentemente da presença, ou não, de SHAM. Estes resultados indicam-nos que o SHAM é de facto um inibidor específico da via alternativa e que o seu efeito em células sem AOX é desprezável. Adicionalmente, os resultados demonstraram que o tratamento com todos os indutores de stress oxidativo resultou na acumulação de ROS que foi particularmente evidente nos tratamentos com o voriconazol e menadiona em que aproximadamente 30% das células apresentaram acumulação de ROS (Painel 2). A avaliação da cinética de tratamento permitiu constatar, à excepção do tratamento com peróxido de hidrogénio, que todos os outros indutores de stress oxidativo provocavam um aumento do número de células ROS positivas no início do tratamento mas que este número tendencialmente diminuiu ao longo do tempo indicando a activação de algum mecanismo antioxidante por parte das células (Painel 2).



Painel 2: Percentagem de células de *Saccharomyces cerevisiae* 4072 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.

Os 6 isolados clínicos de *C. krusei* apresentaram um comportamento bastante heterogéneo no que diz respeito ao stress oxidativo, avaliado pela acumulação de ROS induzida pelos diferentes agentes testados.

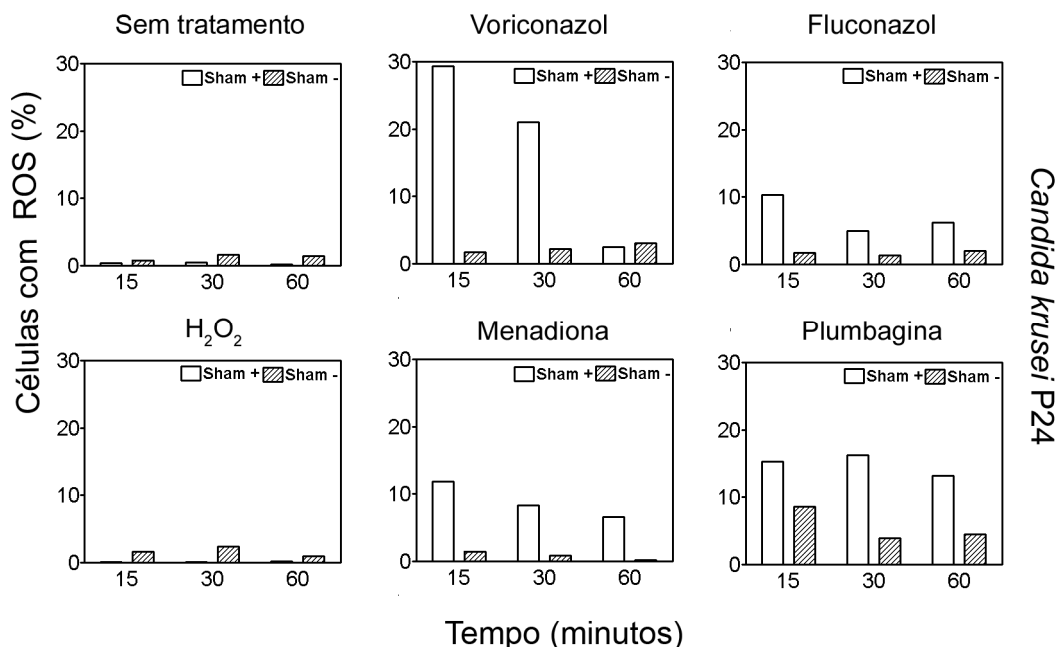
Assim, células de *C. krusei* P21 demonstraram ser muito resistentes à acumulação de ROS após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo em particular ao peróxido de hidrogénio. No entanto, a resistência à acumulação de ROS de *C. krusei* P21 foi revertida quando a AOX foi inibida pelo SHAM sendo esta reversão particularmente evidente nos tratamentos com fluconazol e plumbagina embora igualmente detectada para os tratamentos com voriconazol e menadiona (Painel 3).



Painel 3: Percentagem de células de *Candida krusei* P21 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.

Comportamento semelhante foi observado nas células de *C. krusei* P24. De facto, estas células também se mostraram muito resistentes à acumulação de ROS induzida pelos diferentes indutores de stress oxidativo, em particular ao peróxido de hidrogénio. Mais uma vez a inibição da AOX resultou num aumento da percentagem de células com acumulação de ROS. No entanto, ao contrário da estirpe *C. krusei* P21, este aumento foi mais evidente nos tratamentos com voriconazol onde a inibição da AOX resultou em

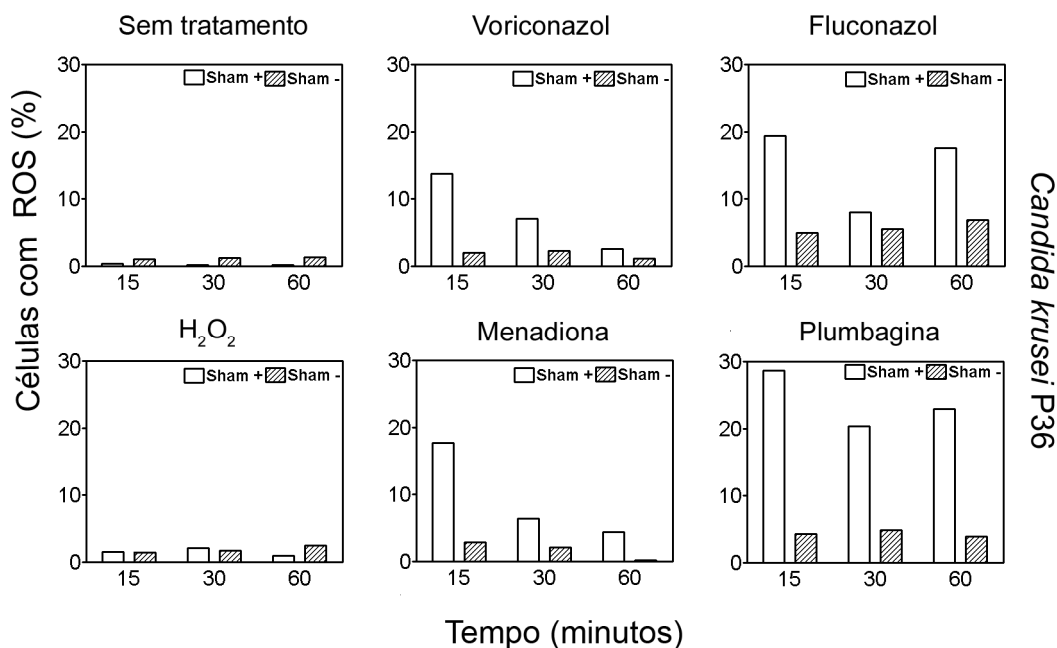
aproximadamente 30% das células com ROS aos 15 minutos (Painel 4). O padrão de comportamento observado na estirpe anterior repete-se na plumbagina mas em percentagens inferiores (Painel 4).



Painel 4: Percentagem de células de *Candida krusei* P24 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.

As células de *C. krusei* P36 apresentam uma resposta muito semelhante à observada nos isolados clínicos de *C. krusei* P21 e P24 e patente na elevada resistência à acumulação de ROS induzida pelo peróxido de hidrogénio (Painel 5). A inibição da AOX reverteu esta resistência a todos os indutores de stress oxidativo, com excepção do peróxido de hidrogénio, e à semelhança do observado para as estirpes de *C. krusei* P21 e P24. A reversão da resistência à acumulação de ROS por inibição da AOX é clara nos tratamentos com fluconazol e plumbagina.

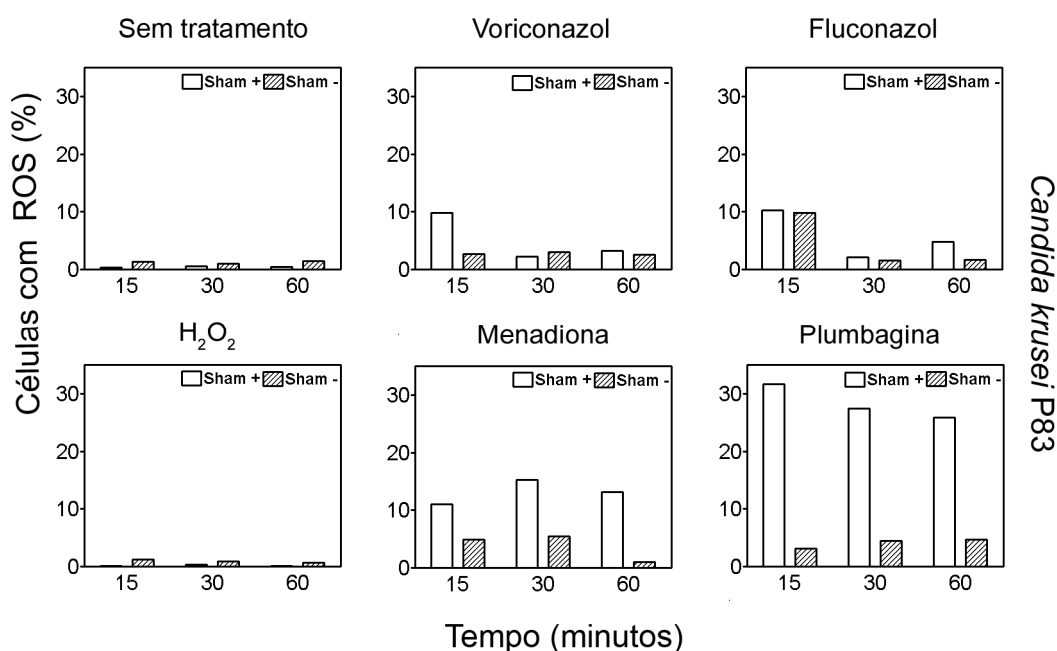
As células da estirpe *C. krusei* P83 demonstraram uma clara resistência à acumulação de ROS induzida por todos os indutores de stress oxidativo novamente com particular relevância para o peróxido de hidrogénio, no entanto, foi também possível detectar que os dois antifúngicos testados, voriconazol e fluconazol não induziram acumulação de ROS.



Painel 5: Percentagem de células de *Candida krusei* P36 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.

De facto, a inibição da AOX por SHAM não reverteu de maneira significativa a percentagem de células com acumulação de ROS após tratamento com os dois antifúngicos, o que parece indicar, por um lado, que para esta estirpe a contribuição da AOX é negligenciável e, por outro, que estes dois antifúngicos nas concentrações testadas não induzem stress oxidativo (Painel 6). Mais uma vez destaca-se nestas células a reversão do fenótipo de resistência ao stress oxidativo induzido pela plumbagina aquando da inibição da actividade da AOX.

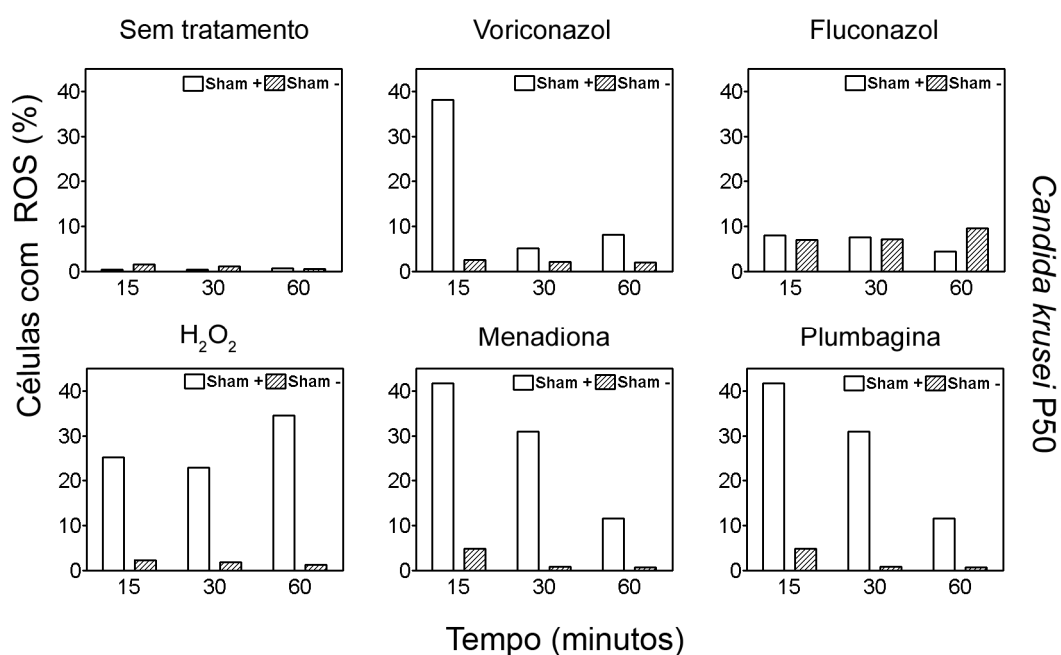
As células das estirpes de *C. krusei* P50 e P51 mostraram ter uma resposta muito semelhante entre si mas com diferenças assinaláveis quando comparadas com as células das estirpes de *C. krusei* P21, P24 e P36 (Painéis 7 e 8). O fluconazol induziu acumulação de ROS numa percentagem mínima de células de ambas as estirpes e a inibição da AOX não produziu nenhum efeito nesta percentagem, indicando que a resistência destas células ao fluconazol está pouco relacionada com a actividade da AOX ou que o stress oxidativo não está na origem da toxicidade produzida pelo fluconazol



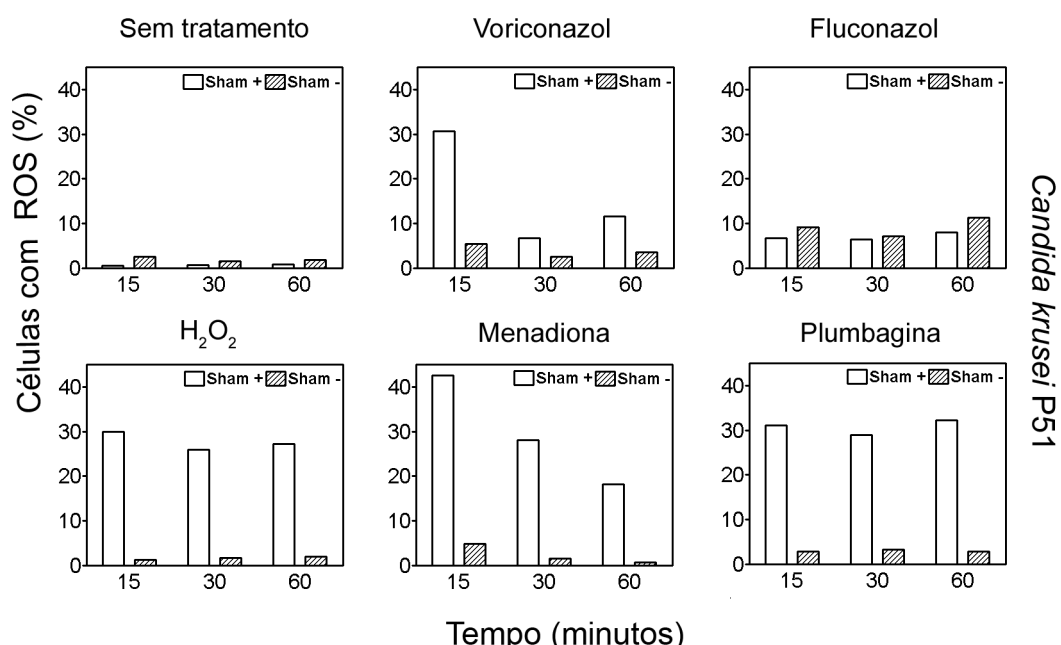
Painel 6: Percentagem de células de *Candida krusei* P83 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.

Também o voriconazol induziu acumulação de ROS numa percentagem mínima de células de ambas as estirpes mas a inibição da AOX produziu efeito significativo aos 15 minutos com percentagens perto dos 40%. Na exposição aos indutores do stress oxidativo, menadiona, plumbagina e peróxido de hidrogénio foram observados em *C. krusei* P50 e P51 comportamentos distintos em relação às outras estirpes estudadas. Com efeito em todos os tratamentos as células de *C. krusei* P50 e P51 apresentaram resistência à acumulação de ROS na ausência de inibidor da AOX. Mas aquando da adição de SHAM, observaram-se percentagens elevadas de células com acumulação de ROS com resultados que variam entre os 20% e 40%. Esta observação permite-nos deduzir que estas duas estirpes apresentam resistência aos indutores de stress oxidativo devido à presença da AOX e que as concentrações de todos os indutores de stress oxidativo são suficientes para promover altos níveis de acumulação de ROS a nível das células fúngicas.

A avaliação cinética de todos os tratamentos permitiu verificar comportamentos diferentes com os vários indutores de stress oxidativo. Globalmente a cinética dos tratamentos na ausência de SHAM não revelou diferenças na percentagem de células com



Painel 7: Percentagem de células de *Candida krusei* P50 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.



Painel 8: Percentagem de células de *Candida krusei* P51 com acumulação de espécies reactivas de oxigénio após tratamento com os diferentes indutores de stress oxidativo.

acumulação de ROS ao longo do tempo, o que parece sugerir que a actividade da AOX permite manter os níveis intracelulares de ROS baixos e constantes sem grandes alterações ao longo do tempo.

Em relação aos tratamentos na presença de SHAM foi possível observar comportamentos distintos na percentagem de células com acumulação de ROS ao longo do tempo. Dependendo do tratamento, observou-se dois tipos de resposta por parte das células aquando da inibição da AOX. De facto, certas estirpes apresentaram uma percentagem de células com ROS acumuladas constantes ao longo do tempo, sugerindo que a cinética dos tratamentos não permitiu desencadear nas células mecanismos de protecção contra o stress oxidativo. Noutras estirpes verificou-se a queda nas percentagens de células com ROS acumuladas ao longo do tempo, indicando que o tempo de exposição permitiu desencadear outros mecanismos de acção antioxidantes por parte das células de *C. krusei*.

4. Discussão

O presente estudo teve como principal objectivo determinar qual a relevância da oxidase alternativa (AOX) na resistência ao stress oxidativo em *Candida krusei*. Para tal foram utilizados isolados clínicos de *C. krusei* previamente descritos como possuindo a actividade da AOX (Oliveira S e colaboradores, trabalho não publicado) e uma outra levedura, *Saccharomyces cerevisiae* sem actividade da AOX. Estas células foram submetidas a diferentes indutores de stress oxidativo (peróxido de hidrogénio, menadiona e plumbagina) e a dois antifúngicos o fluconazol e o voriconazol. A percentagem de células com níveis elevados de espécies reactivas de oxigénio (ROS) foi avaliada no decorrer dos tratamentos, na presença e na ausência de ácido salicilhidroxâmico (SHAM).

Como já descrito, os agentes antifúngicos testados, o fluconazol e o voriconazol são dois azóis, cuja actividade fungistática se baseia na depleção de ergosterol, acumulação de percursores e perda da integridade da membrana fúngica (Fica AC, 2004) (Ghannoum MA et al., 1999). Dados os diversos casos de resistência ao fluconazol que surgiram nos últimos anos, foram desenvolvidos novos triazóis para uso sistémico, tais como: o voriconazol que para além de inibir a enzima lanosterol C14 α desmetilase, inibe também a enzima 24-metileno dihidrolanosterol desmetilase o que poderá estar na base da sua eficácia aumentada no tratamento de infecções fúngicas em imunodeprimidos com aspergilose e candidíases invasivas (Canuto MM et al., 2002). Contudo, algumas espécies de *Candida*, e em particular *C. krusei*, têm sido descritas como bastante resistentes a estes azóis (Berrouane YF et al., 1996) cujos mecanismos envolvidos neste processo de resistência ainda são pouco compreendidos.

A literatura revela-nos que a acção de certos antifúngicos como o miconazol, um outro azole, pode envolver a formação de ROS promovendo stress oxidativo (Aerts AM et al., 2007). Também, foi previamente descrito que o fluconazol também induz em *C. albicans* a produção e acumulação de ROS embora em menor extensão do que o miconazol (Odds FC et al., 1986; Kobayashi D et al., 2002). Os resultados obtidos neste estudo mostram que o fluconazol induz a produção de ROS numa percentagem muito pequena, aproximadamente entre 0 e 10%, das células dos diferentes isolados clínicos testados. Estes resultados são consistentes com a descrita resistência demonstrada por *C. krusei* ao fluconazol (Berrouane YF et al., 1996) e com os baixos níveis de ROS induzidos por este azole (Odds FC et al., 1986). Por outro lado, o mesmo comportamento foi observado nas células tratadas com voriconazol, em que a percentagem de células com acumulação de

ROS é sempre inferior a 10%. Estes resultados parecem indicar que a indução de ROS não está na base do mecanismo fungistático destes antifúngicos. No entanto, verifica-se que aquando da inibição específica da AOX pelo SHAM a percentagem de células dos isolados *C. krusei* P21, P24 e P36, com acumulação de ROS aumenta para ambos os tratamentos com voriconazol e fluconazol. Estes dados parecem sugerir que estes antifúngicos podem, eventualmente, induzir algum stress oxidativo e que a actividade da AOX permite às células diminuir a produção de ROS, revelando o possível envolvimento desta enzima na resistência aos antifúngicos indutores de stress oxidativo. Relativamente aos isolados clínicos de *C. krusei* P50, P51 e P83 este mesmo comportamento só foi observado aquando do tratamento com voriconazol o que sugere que nestas estirpes o mecanismo de resistência ao fluconazol não se baseia unicamente na actividade da AOX. De salientar que os comportamentos heterogéneos dos diferentes isolados clínicos observados demonstram a especificidade de cada estirpe como agente patogénico.

Como referido anteriormente, a resistência aos antifúngicos depende de mecanismos multifactoriais nomeadamente a alteração na captura da droga, na enzima alvo, nas enzimas da síntese de ergosterol e finalmente na presença de bombas de efluxo na célula fúngica (White TC, 1998). No entanto, de acordo com os resultados obtidos podemos concluir que a resistência aos antifúngicos por parte de algumas estirpes pode estar relacionada com a capacidade que a actividade da AOX tem de impedir a produção de ROS induzida por estes agentes.

Por definição a AOX tem um papel importante na diminuição da produção de ROS aquando da indução de stress oxidativo e vários autores demonstraram que nas plantas, baixas temperaturas, choque osmótico, senescência e o peróxido de hidrogénio activam a respiração ciano-resistente (McIntosh L, 1994). Nos fungos, apesar de existirem vários estudos que demonstram a presença da AOX, a sua relação com o stress oxidativo foi ainda pouco explorada. Mas, no presente estudo, a relevância da actividade da AOX na resistência ao stress oxidativo foi reforçada pelos resultados obtidos nos tratamentos com os indutores de stress oxidativo, o peróxido de hidrogénio, a menadiona e a plumbagina. De facto, à excepção do peróxido de hidrogénio, onde a resistência dos isolados clínicos à acumulação de ROS pode estar relacionada com as baixas concentrações usadas, para todas as estirpes assistiu-se a um aumento da percentagem de células com níveis elevados de ROS após tratamento com SHAM. Estes dados são particularmente significativos se analisarmos os resultados do tratamento com plumbagina. Com efeito, a plumbagina revelou-se um potente indutor de ROS quando a AOX se encontrava inibida

pelo SHAM. A plumbagina pertence à classe das naftoquinonas e tal como as quinonas tem a capacidade de captar os electrões e transferi-los directamente para o oxigénio molecular com consequente produção de anião superóxido (Søballe B et al. 1999). Os resultados desta investigação mostram que a actividade da AOX, presente nos isolados clínicos de *C. krusei*, permite diminuir a produção de ROS e muito provavelmente conferir alguma resistência a estas células ao tratamento com plumbagina. Diferentes estudos apontam a plumbagina como um potente agente antifúngico com um elevado espectro de acção contra *C. albicans* (Paiva S et al., 2003). No entanto, e apesar de um estudo mais recente confirmar a capacidade antifúngica desta substância quando comparada ao cetoconazol em vários fungos patogénicos, nomeadamente em *C. krusei* (Dzoyem JP et al., 2007), não podemos menosprezar a presença ou não da AOX devido ao facto dela aumentar a resistência das células fúngicas à acção oxidante da plumbagina.

Globalmente, a presença de SHAM aumentou, na generalidade das estirpes tratadas, a percentagem de células com elevados níveis de ROS indicando que a AOX constitui um relevante mecanismo de defesa ao stress oxidativo. Em certas estirpes foi observada a reversão gradual, ao longo dos tempos de exposição, da percentagem de células com níveis elevados de ROS, quando em contacto com o SHAM, sugerindo que para além da presença da AOX existem nas células outros mecanismos antioxidantes relevantes.

Relativamente ao controlo negativo, *S. cerevisiae*, a sua susceptibilidade aos vários indutores de stress oxidativo permitiu evidenciar o papel da AOX no stress oxidativo uma vez que na ausência ou presença de SHAM a percentagem de células com ROS foi semelhante, reforçando o papel da AOX nos fungos patogénicos.

Assim, a partir do presente estudo podemos concluir que a AOX ocupa um papel importante aquando da indução de stress oxidativo provocado ou não por agentes antifúngicos. Tal como nas plantas, a indução de stress oxidativo vai promover a produção excessiva de ROS e a AOX através do "by pass" que cria na cadeia respiratória transfere o excesso de electrões para o oxigénio restabelecendo o equilíbrio. Desta forma, novos estudos devem ser direccionados no sentido de uma melhor compreensão da acção da AOX e do seu papel na resistência a alguns antifúngicos principalmente os que induzem stress oxidativo. De igual modo, a presença da AOX deve ser tida em conta para o desenho de novas drogas mais eficientes para o tratamento de infecções por espécies *Candida* não *albicans*. De facto, estas leveduras assumem particular relevância devido à sua virulência e patogenicidade em indivíduos imunocomprometidos, o que resulta numa taxa de mortalidade significativa, associada à ocorrência de resistência às drogas

antifúngicas correntemente usadas (Krcmery V et al., 2002). De entre as espécies não *albicans*, *C. krusei* aparece como bastante problemática dada a sua resistência quase universal aos derivados azólicos. Assim, esta investigação permitiu elucidar a acção da AOX como possível mecanismo de defesa que poderá contribuir para a resistência de *C. krusei* a estes agentes antifúngicos mas também às ROS produzidas pelos fagócitos aquando da resposta imunitária induzida por este agente patogénico.

5. Conclusão

Com o presente estudo pretendeu-se avaliar a resposta ao stress oxidativo em células de *C. krusei* e determinar de que forma a presença da AOX está relacionada com a resposta ao stress oxidativo. Assim foram esclarecidos os seguintes pontos:

- A avaliação da acumulação de espécies reactivas de oxigénio (ROS) em células de *Candida krusei* tratadas com diferentes indutores de stress oxidativo (peróxido de hidrogénio, menadiona ou plumbagina) e com antifúngicos (fluconazol ou voriconazol) permitiu verificar comportamentos distintos por parte dos diferentes isolados clínicos traduzindo a sua especificidade como agente patogénico.
- A determinação do papel da AOX na resposta ao stress oxidativo em células de *C. krusei* através do estudo dos efeitos da sua inibição específica pelo SHAM permitiu elucidar a sua contribuição na resposta ao stress oxidativo induzido pelos antifúngicos e oxidantes.
- Relativamente à resistência aos antifúngicos por parte de *C. krusei*, a AOX deverá ser considerada como um possível mecanismo nos vários processos de resistência já descritos.

Como conclusão final de todo este trabalho e como profissional de saúde gostaria de expressar o meu agrado na sua execução, uma vez que proporcionou várias experiências tanto a nível pessoal como profissional. Toda a elaboração deste estudo permitiu conhecer novas perspectivas de vida desconhecidas. O enriquecimento dos conhecimentos tanto a nível teórico, prático e pessoal está bem patente neste trabalho de investigação. A nível teórico porque foram aprofundados os conhecimentos em micologia nomeadamente nos vários mecanismos de resistência aos antifúngicos e também o funcionamento da mitocôndria e sua cadeia respiratória. Na vertente prática, onde como técnica de análises clínicas foram conhecidas novas práticas, em particular a observação microscópica por epifluorescência e sua respectiva interpretação. Pessoalmente é notório o amadurecimento como ser humano uma vez que o contacto no laboratório de investigação proporcionou novas experiências de dinâmica de grupo onde é de louvar o espírito de equipa sempre presente no decurso desta investigação.

6. Bibliografia

- Abi-Said D, Anaissie E, Uzun O, Raad I, Pinzowski H, Vartivarian S. The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species. *Clin Infect Dis.* 1997; 24:1122-8.
- Aerts AM, François IEJA, Meert EMK, Li Q-T, Cammue BPA, Thevissen K: The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from *Raphanus sativus*, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol.*2007; 13:243-247.
- Akhter S, McDade HC, Gorlach JM, Heinrich G, Cox GM, Perfect JR. Role of Alternative Oxidase Gene in Pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 2003; 71: 5794-5802.
- Andriole VT. Current and future antifungal therapy: new targets for antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.*1999; 44: 151-162.
- Beck-Sague C, Jarvis WR, and the National Nosocomial Infections Surveillance System. Secular trends in the epidemiology of nosocomial infections in the United States, 1980-1990. *J Infect Dis.* 1993;167:1247-1251.
- Berrouane YF, Hollis RJ, Pfaller MA. Strain variation among and antifungal susceptibilities of isolates of *Candida krusei*. *J. Clin. Microbiol.* 1996; 34:1856-1858.
- Boveris A, Cadenas E, in: Superoxide Dismutases, Vol. 2 (Oberley, L.W., Ed.), 1982; 15 – 30, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Brajtburg J, Bolard J. Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996; 9: 512-531.

- Brun S, Aubry C, Lima O, Filmon R, Bergès T, Chabasse D, Bouchara JP. Relationships between Respiration and Susceptibility to Azole Antifungals in *Candida glabrata*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003; 47: 847-853.
- Canuto MM, Rodero F.G. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. *Lancet Infect. Dis.* 2002; 2:550-563.
- Chaudhuri M, Hill GC. Cloning, sequencing, and functional activity of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1996; 83:125–129.
- Charlier C, Hart E, Lefort A, Ribaud P, Dromer F, Denning DW, Lortholary O. Fluconazole for the management of invasive candidiasis: where do we stand after 15 years? *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57: 384 - 410.
- Chen JW, Sun CM, Sheng WL, Wang Y-C, Syu W-Jr. Expression Analysis of Up-Regulated Genes Responding to Plumbagin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2006; 188: 456-463.
- Chiou CC, Groll AH, Walsh TJ. New Drugs and Novel Targets for Treatment of Invasive Fungal Infections in Patients with Cancer. *Oncologist.* 2000; 5: 120-135.
- Colombo AL, Guimarães T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida* spp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2003; 36: 599-607.
- Costa V, Moradas-Ferreira P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol. Aspects Med.* 2001; 22:217–246.
- Denning DW. Echinocandins and pneumocandins-a new antifungal class with a novel mode of action. *J. Antimicrob. Chemother.* 1997; 40:611-614.

- Dignani MC, Anaissie EJ, Hester JP, O'Brien S, Vartivarian SE, Rex JH, Kantarjian H, Jendiroba DB, Lichtiger B, Andersson BS, Freireich EJ. Treatment of neutropenia-related fungal infections with granulocyte colony-stimulating factor-elicited white blood cell transfusions: a pilot study. *Leukemia* 1997; 11: 1621-1630.
- Dinant M, Baurain D, Matagne RF. Characterization of a cDNA encoding the mitochondrial alternative oxidase (AOX) in *Chlamydomonas reinhardtii* and assays of AOX inactivation by the antisense strategy, 1998; 441–444. In Moller IM, Giardestrom P, Glimelius K, Glaser E (ed.), Plant mitochondria: from gene to function. Backhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Dzoyem JP, Tangmouo JG, Lontsi D, Etoa FX, Lohoue PJ. In vitro antifungal activity of extract and plumbagin from the stem bark of *Diospyros crassiflora* Hiern (Ebenaceae). *Phytother Res* 2007; 21: 671-674.
- Fica AC. Treatment of systemic fungal infections. First part: Fluconazole, itraconazole and voriconazole. *Rev. chil. Infectol.* 2004; 21:26-38.
- Fridkin SK, Jarvis WR. Epidemiology of Nosocomial fungal infections. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 499-511.
- Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1999; 12: 501-517.
- Gourlay CW, Ayscough KR. Actin Induced Hyperactivation of the Ras Signaling Pathway Leads to Apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol. Cell. Biol.* 2006;26: 6487-6501.
- Grant CM, MacIver FH, Dawes IW. Mitochondrial function is required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*.1997; 30:219-222.

- Guérin M, Camougrand N. The alternative oxidase of *Candida parapsilosis*. *Eur. J. Biochem.* 1986; 159: 519-524.
- Helmerhorst EJ, Murphy MP, Troxler RF, Oppenheim FG. Characterization of the mitochondrial respirator pathways in *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* 2002; 1556:73–80.
- Helmerhorst EJ, Stan M, Murphy MP, Sherman F, Oppenheim FG. The concomitant expression and availability of conventional and alternative, cyanide-insensitive, respiratory pathways in *Candida albicans*. *Mitochondrion* 2005; 5:200-211.
- Hiramoto F, Nomura N, Furumai T, Oki T, Igarashi Y. Apoptosis-like cell death of *Saccharomyces cerevisiae* induced by a mannose-binding antifungal antibiotic, pradimicin. *J Antibiot.* 2003; 56: 768–772.
- Huh WK, Kang SO. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem J.* 2001; 356: 595–604.
- Imlay J, Fridovich I. Exogenous quinones directly inhibit the respiratory NADH dehydrogenase in *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1992; 296:337-346.
- Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Hryniewiecka L, Michejda J, Sluse F. Electron partitioning between the two branching quinol-oxidizing pathways in *Acanthamoeba castellanii* mitochondria during steady-state 3 respiration. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:10174–10180.
- Johnson CH, Prigge JT, Warren AD, McEwen JE. Characterization of an alternative oxidase activity of *Histoplasma capsulatum*. *Yeast.* 2003; 20:381-388.
- Joseph-Horne T, Hollomon DW, Wood PM. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001; 1504:179–195.

- Kirimura K, Yoda M, Usami S. Cloning and expression of the cDNA encoding an alternative oxidase gene from *Aspergillus niger* WU-2223L. *Curr. Genet.* 1999; 34:472-477.
- Kobayashi D, Kondo K, Uehara N, Otokoza S, Tsuji N, Yagihashi A, Watanabe N. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002; 46:3113-3117.
- Kumamoto CA, Vences MD. Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence. *Cellular Microbiology*. 2005; 7:1546–1554.
- Krcmery V, Barnes AJ. Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungemia: pathogenicity and antifungal resistance. *Journal of Hospital Infection*. 2002; 50: 243-260.
- Leiter E, Szappanos H, Oberparleiter C, Kaiserer L, Csernoch L, Pusztahelyi T, Emri T, Pócsi I, Salvenmoser W, Marx F. Antifungal protein PAF severely affects the integrity of the plasma membrane of *Aspergillus nidulans* and induces an apoptosis-like phenotype. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 2445–2453.
- Lortholary O, Dupont B. Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10: 477–504.
- Madeo F, Fröhlich E, Ligr M, Grey M, Sigrist SJ, Wolf DH, Fröhlich K-U. Oxygen stress: a regulator for apoptosis in yeast. *J Cell Biol.* 1999; 145: 757–767.
- Mago N, Khuller GK. Influence of lipid composition on the sensitivity of *Candida albicans* to antifungal agents. *Indian J. Biochem. Biophys.* 1989; 26:30–33.
- Marichal P, Gorrens J, Coene MC, LeJeune L, Vanden Bossche H. Origin in differences in susceptibility of *Candida krusei* to azole antifungal agents. *Mycoses*, 1995; 38:111-117.
- Maxwell DP, Wang Y, McIntosh L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant. *Cells PNAS*. 1999; 96: 8271 – 8276.

- McIntosh L. Molecular biology of the alternative oxidase. *Plant Physiology*. 1994; 105:781–786.
- Mertz WG, Karp JE, Schron D, Saral R. Increased incidence of fungemia caused by *C.krusei*. *J Clin Microbiol*. 1986; 581-584.
- Milani G, Jarmuszkiewicz W, Sluse-Goffart CM, Schreiber AZ, Vercesi AE, Sluse FE. Respiratory chain network in mitochondria of *Candida parapsilosis*: ADP/O appraisal of the multiple electron pathways. *FEBS Letters*. 2001; 508: 231-235.
- Miller RA, Britigan BE. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin. Microbiol*. 1997; 10:1–18.
- Minagawa N, Koga S, Nakano M, Sakajo S, Yoshimoto A. Possible involvement of superoxide anion in the induction of cyanide-resistant respiration in *Hansenula anomala*. *FEBS Lett*. 1992; 302: 217– 219.
- Missall TA, Lodge JK e McEwen JE. Mechanisms of Resistance to Oxidative and Nitrosative Stress: Implications for Fungal Survival in Mammalian Hosts *Eukaryot. Cell*. 2004; 3: 835-846.
- Moore AL, Siedow JN. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*. 1991; 1059:121-140.
- Moradas-Ferreira P, Costa V. Adaptative response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to reactive oxygen species: defences, damages and death. *Redox Report*. 2000; 5:277 – 285.
- Morschhäuser J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*. 2002; 1587:240-248.

- Naglik JR, Challacombe SJ, Bernhard H. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003; 67: 400-428.
- Narasimhan ML, Damsz B, Coca MA, Ibeas JI, Yun DJ, Pardo JM, Hasegawa PM, Bressan RA. A plant defense response effector induces microbial apoptosis. *Mol Cell.* 2001; 8: 921-930.
- Odds FC, Cheesman SL, Abbott AB. Antifungal effects of fluconazole (UK 49858), a new triazole antifungal, in vitro. *J. Antimicrob. Chemother.* 1986; 18:473–478.
- Paiva SR, Figueiredo MR, Aragao TV, Kaplan MA. Antimicrobial activity in vitro of plumbagin isolated from *Plumbago* species. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2003; 98:959-961.
- Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell. Biochem.* 1997; 174:305–319.
- Phillips AJ, Sudbery I, Ramsdale M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 14327–14332.
- Polak A. Antifungal therapy in *Antifungal Agents-Advances and Problems*. Jucker E. 2003.
- Popov VN, Simonian RA, Skulachev VP, Starkov AA. Inhibition of the alternative oxidase stimulates H₂O₂ production in plant mitochondria. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 1997; 415:87–90.
- Sanati H, Belanger P, Fratti R, Ghannoum M. A new triazole, voriconazole (UK-109,496), blocks sterol biosynthesis in *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41: 2492-2496.

- Sandven P, Nilsen K, Digranes A, Tjade T, Lassen J. *Candida norvegensis*: a fluconazole-resistant species. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997; 41:1375-1376.
- Schonbaum GR, Bonner WD, Storey BT, Bahr JT. Specific Inhibition of the Cyanide-insensitive Respiratory Pathway in Plant Mitochondria by Hydroxamic Acids *Plant Physiol.* 1971;47: 124-128.
- Siedow JN, Umbach AL. The mitochondrial cyanide resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim. Biophys. Acta* .2000; 1459, 432–439.
- Søballe B, Poole RK. Microbial ubiquinones: multiple roles in respiration, gene regulation and oxidative stress management. *Microbiology.* 1999;145:1817-30.
- Steen BR, Lian T, Zuyderduyn S, MacDonald WK, Marra M, Jones SJM, Kronstad, JW. Temperature-Regulated Transcription in the Pathogenic Fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genome Res.* 2002; 12: 1386-1400.
- Thevissen K, Ayscough KR, Aerts AM, Du W, De Brucker K, Meert EMK, Ausma J, Borgers MI, Cammue Bruno PA, François IEJA. Miconazole Induces Changes in Actin Cytoskeleton prior to Reactive Oxygen Species Induction in Yeast *J. Biol. Chem.* 2007; 282: 21592-21597.
- Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, Kibbler C, Peman J, Klingspor L, Grillot R. Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2004; 23: 317– 22.
- Vanlerberghe GC e McIntosh L. Alternative oxidase: From Gene to Function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology.* 1997; 48: 703-73.
- Vanlerberghe GC, Robson CA, Yip JY. Induction of mitochondrial alternative oxidase in response to a cell signal pathway down-regulating the cytochrome pathway prevents programmed cell death. *Plant Physiol.* 2002; 129:1829–1842.

- Wagner AM. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett.*1995; 368:339-342.
- Wagner AM e Moore AL. Structure and function of the plant alternative oxidase: Its putative role in the oxygen defense mechanism. *Biosci. Rep.* 1997; 17:319-333
- Westwater C, Balish E, Schofield DA. *Candida albicans*-Conditioned Medium Protects Yeast Cells from Oxidative Stress: a Possible Link between Quorum Sensing and Oxidative Stress Resistance. *Eukaryot. Cell.* 2005; 4: 1654-1661.
- Wey SB, Mori M, Pfaller MA, Woolson RF, Wenzel RP. Hospital-acquired candidemia. The attributable mortality and excess length of stay. *Arch Intern Med.* 1988; 148:2642–2645.
- White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, Cellular, and Molecular Factors That Contribute to Antifungal Drug Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11: 382-402.
- Wood PM, Hollomon DW. A critical evaluation of the role of alternative oxidase in the performance of strobilurin and related fungicides acting at the Q_o site of Complex III. *Pest management science.*2003; 59:499-511.
- Wróbel M, Jurkowska H. Menadione effect on L-cysteine desulfuration in U373 cells. *Acta Biochim Pol.* 2007; 54:407-11.